

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6952716号

(P6952716)

(45) 発行日 令和3年10月20日 (2021. 10. 20)

(24) 登録日 令和3年9月30日 (2021. 9. 30)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 16/46 (2006. 01)

C O 7 K 16/46 Z N A

C O 7 K 16/28 (2006. 01)

C O 7 K 16/28

C 1 2 N 15/13 (2006. 01)

C 1 2 N 15/13

C 1 2 N 1/15 (2006. 01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006. 01)

C 1 2 N 1/19

請求項の数 11 (全 129 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-557864 (P2018-557864)
 (86) (22) 出願日 平成29年5月5日 (2017. 5. 5)
 (65) 公表番号 特表2019-520797 (P2019-520797A)
 (43) 公表日 令和1年7月25日 (2019. 7. 25)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/031356
 (87) 国際公開番号 W02017/193032
 (87) 国際公開日 平成29年11月9日 (2017. 11. 9)
 審査請求日 令和2年5月1日 (2020. 5. 1)
 (31) 優先権主張番号 62/332, 788
 (32) 優先日 平成28年5月6日 (2016. 5. 6)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 504333972
 メディミュン、エルエルシー
 アメリカ合衆国 20878 メリーラン
 ド州、ゲイサーズバーグ、ワン メディミ
 ユン ウェイ
 (74) 代理人 110002572
 特許業務法人平木国際特許事務所
 (72) 発明者 カツリランガン、スリナス
 アメリカ合衆国 20878 メリーラン
 ド州、ゲイサーズバーグ、ワン メディミ
 ユン ウェイ、メディミュン、エルエ
 ルシー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 二重特異性結合タンパク質およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 9 のアミノ酸配列を含む第 1 の重鎖、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む第 1 の軽鎖、配列番号 12 のアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖、及び配列番号 4 のアミノ酸配列を含む第 2 の軽鎖を含む、PD-1 及び CTLA-4 に結合する二重特異性結合タンパク質。

【請求項 2】

Fc 領域が非グリコシル化されている、請求項 1 記載の二重特異性結合タンパク質。

【請求項 3】

Fc 領域が脱グリコシル化されている、請求項 1 記載の二重特異性結合タンパク質。

【請求項 4】

Fc 領域が、低フコシル化を有するか、又は非フコシル化されている、請求項 1 記載の二重特異性結合タンパク質。

【請求項 5】

請求項 1 記載の二重特異性結合タンパク質と薬学的に許容されるキャリアとを含む組成物。

【請求項 6】

請求項 1 記載の二重特異性結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子。

【請求項 7】

請求項 6 記載の核酸分子を含むベクター。

10

20

【請求項 8】

請求項 7 記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 9】

請求項 1 記載の二重特異性結合タンパク質を含む、対象において癌を治療又は予防するための医薬組成物。

【請求項 10】

前記癌が、卵巣癌、乳癌、大腸癌、前立腺癌、子宮頸癌、子宮癌、精巣癌、膀胱癌、頭部及び頸部癌、黒色腫、膵臓癌、腎細胞癌並びに肺癌のうちの1つ又は複数である、請求項 9 記載の医薬組成物。

【請求項 11】

請求項 1 記載の二重特異性結合タンパク質を含む、対象において免疫応答を増強するための医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2016年5月6日に提出された米国仮特許出願第62/332,788号明細書に対する優先権およびその利益を主張し、その開示内容は、その全体が参照により本明細書に援用される。

【0002】

配列表

本出願は、電子フォーマットの配列表と一緒に提供されている。この配列表は、2017年5月2日に作成され、サイズが244kbである「IOBS_100_ST25.txt」という名称のファイルとして提供される。配列表の電子フォーマット内の情報は、その全体が参照により本明細書に援用される。

【0003】

技術分野

本発明は、二重特異性結合タンパク質およびその使用に関する。

【背景技術】

【0004】

癌は、依然として主要な健康上の世界的負担である。癌の治療の進歩にもかかわらず、特に既存の治療薬に対して耐性の進行性疾患または癌を有する患者にとってより有効でありかつ毒性の低い治療法に対する満たされていない必要性が引き続き存在する。

【0005】

腫瘍制御における免疫系、特にT細胞媒介性細胞傷害の役割は、十分に認識されている。T細胞が疾患の早期および後期段階の両方で癌患者の腫瘍増殖および癌患者の生存を制御するというエビデンスが一層増えている。しかしながら、癌患者において腫瘍特異的T細胞応答を高め、持続させることは困難である。癌に対する先天性免疫応答を刺激または増強する癌免疫療法薬の継続的な進歩および成功は、こうした治療薬を、非特異的化学療法薬および／または放射線を使用する治療法と比較して魅力的な治療の選択肢にしている。

【0006】

癌に対する癌免疫（IO）療法薬としてのそれらの潜在的有用性のために、いくつかの分子標的が同定されている。癌免疫療法の分野におけるそれらの治療薬の可能性について研究されているいくつかの分子標的として、細胞傷害性Tリンパ球抗原4（CTLA-4またはCD152）、プログラム死リガンド1（PD-L1またはB7-H1またはCD274）、プログラム死-1（PD-1）、OX40（CD134またはTNFRSF4）ならびにT細胞阻害性受容体T細胞免疫グロブリンおよびムチンドメイン含有3（TIM3）が挙げられる。これらの標的の一部は、治療に利用することに成功している（たとえば、PD-1およびCTLA-4）が、多くの患者は、開発された治療薬に対して不

10

20

30

40

50

応答性である。また、より高い用量および／または免疫療法薬の併用を含む治療レジメンを検討することもできるが、そうした治療法は、副作用の危険性の増大を伴う恐れがあり、これは、より高い用量および蓄積曝露と共に増大する傾向があり、併用免疫療法と一緒に使用すると相加的になると思われる。いくつかの一般的な副作用として、下垂体炎、甲状腺炎、副腎機能不全、腸炎、皮膚炎、肺臓炎、肝炎、膵炎、運動感覚性ニューロパチー、および関節炎が挙げられる。さらに、免疫療法薬は、典型的に高いコストを伴うため、免疫療法薬の併用を含む治療法は、患者にとって法外な費用となり得る。

【0007】

従って、IO治療薬の候補標的を同定し、既存の標的に対する新規の治療薬を開発し、現在使用中の免疫療法薬の欠点（患者応答性の欠如および併用治療に伴う副作用のリスク増大など）を回避する治療戦略を開発することが依然として求められている。標的分子の組み合わせに対して二重特異性を有するIO治療薬（たとえば、結合タンパク質）、特に個別の単一特異性結合タンパク質の組み合わせに対する結合親和性と比較したときに標的分子に対する優れた結合親和性を呈示するものは、治療的有効性について特に望ましい分子のクラスを提供する。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、2つのエピトープ（たとえば、第1および第2のエピトープ）に結合し、かつ第1および第2のエピトープの各々に結合するために二価である二重特異性分子またはタンパク質を提供する。本発明は、対象において免疫応答を誘導する方法、ならびにタンパク質、核酸分子および／または組成物を対象に投与することにより、対象（たとえば、ヒト対象）において癌を治療または予防する方法も提供する。

20

【0009】

一態様では、本発明は、第1のエピトープに結合する第1の結合ドメイン（BD1）と、第2のエピトープに結合する第2の結合ドメイン（BD2）と、 C_H2 ドメインおよび C_H3 ドメインを有するFc領域とを含むタンパク質であって、Fc領域は、 C_H2 ドメイン、 C_H3 ドメイン、または C_H2 および C_H3 ドメインの境界面における溶媒曝露ループにBD2を含み、タンパク質は、第1および第2のエピトープの各々に結合するために二価である、タンパク質を提供する。

30

【0010】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載されるいずれかの態様に従うタンパク質または抗体と、薬学的に許容されるキャリアを含有する組成物を提供する。

【0011】

別の態様では、本発明は、対象において癌を治療または予防する方法を提供し、この方法は、本明細書に記載されるいずれかの態様に従うタンパク質または抗体を対象（たとえば、ヒト対象）に投与するステップを含む。様々な実施形態では、癌は、卵巣癌、乳癌、大腸癌、前立腺癌、子宮頸癌、子宮癌、精巣癌、膀胱癌、頭部および頸部癌、黒色腫、膵臓癌、腎細胞癌、ならびに肺癌の1つまたは複数である。

40

【0012】

別の態様では、本発明は、対象において免疫応答を誘導する方法を提供し、この方法は、本明細書に記載されるいずれかの態様に従うタンパク質または抗体を対象（たとえば、ヒト対象）に投与するステップを含む。

【0013】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載されるいずれかの態様に従うタンパク質または抗体をコードするヌクレオチド配列を有する核酸分子を提供する。

【0014】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載されるいずれかの態様に従う核酸分子を含有するベクターを提供する。

【0015】

50

別の態様では、本発明は、本明細書に記載されるいずれかの態様に従うベクターを含有する宿主細胞を提供する。

【0016】

一態様では、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列を有する第1のペプチドおよび配列番号2のアミノ酸配列を有する第2のペプチドを有するPD-1およびCTLA-4に結合する二重特異性結合タンパク質を提供する。

【0017】

別の態様では、本発明は、配列番号3のアミノ酸配列を有する第1のペプチドおよび配列番号4のアミノ酸配列を有する第2のペプチドを有するPD-1およびCTLA-4に結合する二重特異性結合タンパク質を提供する。

10

【0018】

別の態様では、本発明は、配列番号5のアミノ酸配列を有する第1のペプチドおよび配列番号6のアミノ酸配列を有する第2のペプチドを有するPD-1およびCTLA-4に結合する二重特異性結合タンパク質を提供する。

【0019】

一態様では、本発明は、配列番号9のアミノ酸配列を有する第1の重鎖、配列番号7のアミノ酸配列を有する第1の軽鎖、配列番号12のアミノ酸配列を有する第2の重鎖、および配列番号4のアミノ酸配列を有する第2の軽鎖を有するPD-1およびCTLA-4に結合する二重特異性結合タンパク質を提供する。

【0020】

20

一態様では、本発明は、配列番号14のアミノ酸配列を有する第1のペプチドおよび配列番号15のアミノ酸配列を有する第2のペプチドを有するPD-L1およびCTLA-4に結合する二重特異性結合タンパク質を提供する。

【0021】

別の態様では、本発明は、配列番号16のアミノ酸配列を有する第1のペプチドおよび配列番号17のアミノ酸配列を有する第2のペプチドを有するPD-L1およびCTLA-4に結合する二重特異性結合タンパク質を提供する。

【0022】

別の態様では、本発明は、配列番号18のアミノ酸配列を有する第1のペプチドおよび配列番号19のアミノ酸配列を有する第2のペプチドを有するPD-L1およびCTLA-4に結合する二重特異性結合タンパク質を提供する。

30

【0023】

一態様では、本発明は、配列番号22のアミノ酸配列を有する第1のペプチドおよび配列番号23のアミノ酸配列を有する第2のペプチドを有するPD-1およびTIM3に結合する二重特異性結合タンパク質を提供する。

【0024】

別の態様では、本発明は、配列番号24または配列番号91のアミノ酸配列を有する第1のペプチドおよび配列番号23または配列番号92のアミノ酸配列を有する第2のペプチドを有するPD-1およびTIM3に結合する二重特異性結合タンパク質を提供する。

【0025】

40

一態様では、本発明は、配列番号9のアミノ酸配列を有する第1の重鎖、配列番号7のアミノ酸配列を有する第1の軽鎖、配列番号27または配列番号30のアミノ酸配列を有する第2の重鎖、および配列番号26または配列番号28のアミノ酸配列を有する第2の軽鎖を有するPD-1およびTIM3に結合する二重特異性結合タンパク質を提供する。

【0026】

一態様では、本発明は、配列番号34のアミノ酸配列を有する第1のペプチドおよび配列番号32のアミノ酸配列を有する第2のペプチドを有するOX40およびPD-L1に結合する二重特異性結合タンパク質を提供する。

【0027】

別の態様では、本発明は、配列番号35のアミノ酸配列を有する第1のペプチドおよび

50

配列番号 32 のアミノ酸配列を有する第 2 のペプチドを有する O X 4 0 および P D - L 1 に結合する二重特異性結合タンパク質を提供する。

【0028】

別の態様では、本発明は、配列番号 36 または配列番号 94 のアミノ酸配列を有する第 1 のペプチドおよび配列番号 32 または配列番号 93 のアミノ酸配列を有する第 2 のペプチドを有する O X 4 0 および P D - L 1 に結合する二重特異性結合タンパク質を提供する。

【0029】

別の態様では、本発明は、C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を有する重鎖ならびに C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を有する軽鎖を有する T I M 3 に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを提供し、重鎖 C D R 1 は、配列番号 88 を含み、重鎖 C D R 2 は、配列番号 80 を含み、重鎖 C D R 3 は、配列番号 81 を含み、および軽鎖 C D R 1 は、配列番号 82 を含み、軽鎖 C D R 2 は、配列番号 83 を含み、軽鎖 C D R 3 は、配列番号 84 を含む。

【0030】

他の態様では、本発明は、二重特異性結合タンパク質および薬学的に許容されるキャリアを有する組成物、二重特異性結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する核酸分子、二重特異性結合タンパク質を投与することにより、対象において癌を治療または予防する方法、および二重特異性結合タンパク質を投与することにより、対象において免疫応答を増強する方法を提供する。

【0031】

本明細書に記載されるいずれかの態様の様々な実施形態では、F c 領域は、C_H 2 ドメイン、C_H 3 ドメイン、または C_H 2 および C_H 3 ドメインの境界面におけるアミノ酸配列中の溶媒曝露ループに B D 2 を含む。

【0032】

本明細書に記載されるいずれかの態様の様々な実施形態では、溶媒曝露ループは、C_H 2 ドメイン由来のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、溶媒曝露ループは、アミノ酸配列 I S R T P (配列番号 39) を含む。

【0033】

本明細書に記載されるいずれかの態様の様々な実施形態では、溶媒曝露ループは、C_H 3 ドメイン由来のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、溶媒曝露ループは、アミノ酸配列 S N G を含む。

【0034】

本明細書に記載されるいずれかの態様の様々な実施形態では、溶媒曝露ループは、C_H 2 ドメインおよび C_H 3 ドメインの境界面由来のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、溶媒曝露ループは、アミノ酸配列 A K G Q P (配列番号 40) を含む、請求項 7 に記載のタンパク質である。

【0035】

本明細書に記載されるいずれかの態様の様々な実施形態では、B D 2 は、一本鎖可変フラグメント (s c F v) であるか、またはそれを含む。

【0036】

本明細書に記載されるいずれかの態様の様々な実施形態では、B D 1 は、F a b ドメイン、s c F v、単ドメイン抗体、および抗体可変ドメインの 1 つまたは複数である結合ドメインであるか、またはそれを含む。特定の実施形態では、B D 1 は、F a b ドメインを含む。

【0037】

本明細書に記載されるいずれかの態様の様々な実施形態では、F a b ドメインは、抗体ヒンジ領域を介して F c 領域に連結されている。ある実施形態では、F c 領域は、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A、I g M、I g E、または I g D 由来の F c 領域の 1 つまたは複数であるドメインであるか、またはそれを含む。特定の実施形態では

10

20

30

40

50

、F c 領域は、変異型 F c 領域を含む。いくつかの実施形態では、F c 領域は、非グリコシル化、脱グリコシル化、および／もしくは非フコシル化されているか、または低フコシル化を有する。

【0038】

本明細書に記載されるいずれかの態様の様々な実施形態では、タンパク質は、BD 2 と F c 領域との間にタンパク質リンカー L 1 をさらに含む。本明細書に記載されるいずれかの態様の様々な実施形態では、タンパク質は、BD 2 と F c 領域との間に第 1 のタンパク質リンカー L 1 および第 2 のタンパク質リンカー L 2 をさらに含む。本明細書に記載されるいずれかの態様の様々な実施形態では、BD 2 は、タンパク質リンカー L 1 を介して F c 領域と結合される。本明細書に記載されるいずれかの態様の様々な実施形態では、BD 2 は、2 つのタンパク質リンカー L 1 および L 2 を介して F c 領域と結合される。ある実施形態では、L 1 および L 2 は、 $(G_4S)_2$ (配列番号 41)、 $(G_4S)_3$ (配列番号 42)、および $(G_4S)_4$ (配列番号 43) から独立に選択される。

10

【0039】

本明細書に記載されるいずれかの態様の様々な実施形態では、タンパク質は、N 末端から C 末端に下記のポリペプチドドメイン： $V_H1-C_H1-C_H2$ (N 末端) - BD 2 - C_H2 (C 末端) - C_H3 を有するキメラ重鎖を含み、および BD 1 は、F a b ドメインを含み、 V_H1 は、F a b ドメインの重鎖可変ドメインを含み、および C_H1 は、F a b の重鎖定常ドメイン 1 を含む。

【0040】

20

本明細書に記載されるいずれかの態様の様々な実施形態では、タンパク質は、N 末端から C 末端に下記のポリペプチドドメイン： $V_H1-C_H1-C_H2-BD2-C_H3$ を有するキメラ重鎖を含み、および BD 1 は、F a b ドメインを含み、 V_H1 は、F a b ドメインの重鎖可変ドメインを含み、および C_H1 は、F a b の重鎖定常ドメイン 1 を含む。

【0041】

本明細書に記載されるいずれかの態様の様々な実施形態では、タンパク質は、N 末端から C 末端に下記のポリペプチドドメイン： $V_H1-C_H1-C_H2-C_H3$ (N 末端) - BD 2 - C_H3 (C 末端) を有するキメラ重鎖を含み、および BD 1 は、F a b ドメインを含み、 V_H1 は、F a b ドメインの重鎖可変ドメインを含み、および C_H1 は、F a b の重鎖定常ドメイン 1 を含む。

30

【0042】

本明細書に記載されるいずれかの態様の様々な実施形態では、BD 2 は、s c F v であるか、またはそれを含む。特定の実施形態では、s c F v は、N 末端から C 末端に、 V_H2 - ポリペプチドリンカー - V_L2 または V_L2 ポリペプチドリンカー - V_H2 を含み、 V_H2 は、s c F v の重鎖可変ドメインを含み、および V_L2 は、s c F v の軽鎖可変ドメインを含む。

【0043】

本明細書に記載されるいずれかの態様の様々な実施形態では、タンパク質は、BD 2 と F c 領域との間にタンパク質リンカー L 1 をさらに含む。本明細書に記載されるいずれかの態様の様々な実施形態では、タンパク質は、BD 2 と F c 領域との間に第 1 のタンパク質リンカー L 1 および第 2 のタンパク質リンカー L 2 をさらに含む。

40

【0044】

本明細書に記載されるいずれかの態様の様々な実施形態では、BD 2 は、リンカー (L 1) を介して F c 領域の C_H2 ドメイン、 C_H2 ドメイン、または C_H2 および C_H3 ドメインの境界面に結合される。

【0045】

本明細書に記載されるいずれかの態様の様々な実施形態では、BD 2 は、2 つのタンパク質リンカー L 1 および L 2 を介して F c 領域の C_H2 ドメイン、 C_H3 ドメイン、または C_H2 および C_H3 ドメインの境界面に結合される。様々な実施形態では、L 1 および L 2 は、1 ~ 25 アミノ酸長を有するタンパク質リンカーから独立に選択される。特定の

50

実施形態では、L 1 および L 2 は、 $(G_4 S)_2$ (配列番号 4 1)、 $(G_4 S)_3$ (配列番号 4 2)、および $(G_4 S)_4$ (配列番号 4 3) から独立に選択される。

【0046】

本明細書に記載されるいずれかの態様の様々な実施形態では、第 1 および第 2 のエピトープは異なる。本明細書に記載されるいずれかの態様の様々な実施形態では、第 1 および第 2 のエピトープは同じである。

【0047】

本開示の説明において、本開示の特定の態様が図に示されている。しかしながら、本開示は、図に示した態様の正確な配置および手段に限定されるものではない。

【図面の簡単な説明】

10

【0048】

【図 1-1】本明細書に記載するいくつかの例示的なタンパク質の一般的な概略図を示す。CH 2 および CH 3 領域は、PyMOL を用いて図 1 A ~ 1 C に示され、球体としての溶媒曝露表面ループ領域を明らかにする。図 1 A は、CH 2 領域内のループを描き；図 1 B は、CH 2 - CH 3 境界面内のループを描き；図 1 C は、CH 3 領域内のループを描く。例示的なコンストラクトを図 1 D ~ 1 F に図示するが、これらは、それぞれ Fab および scFv ドメインとして代表的な BD 1 および BD 2 ドメインを含む。図 1 D は、ヒンジ領域で結合した BD 1 と、CH 2 領域内の溶媒曝露ループで結合した BD 2 とを描く。図 1 E は、ヒンジ領域で結合した BD 1 と、CH 2 - CH 3 境界面内の溶媒曝露ループで結合した BD 2 とを描く。図 1 F は、ヒンジ領域で結合した BD 1 と、CH 3 領域内の溶媒曝露ループで結合した BD 2 とを描く。

20

【図 1-2】図 1-1 の続きである。

【図 2-1】本明細書に記載するように、CH 2、CH 2 - CH 3 境界面、および CH 3 における溶媒接触可能ループ配列の拡大図を提供する。BD 2 (scFv) を組み込むコンストラクトの例が図 2 A ~ 2 C の各々に含まれる。図 2 A は、CH 2 - CH 3 境界面上流の CH 2 ループ内で同定された代表的なループ配列 IS RTP (配列番号 3 9) を図示する。図 2 B は、CH 2 - CH 3 境界面内の代表的なループ配列 AKGQP (配列番号 4 0) を図示する。図 2 C は、CH 2 - CH 3 境界面下流の CH 3 領域内の代表的なループ配列 SNG を図示する。

【図 2-2】図 2-1 の続きである。

30

【図 2-3】図 2-2 の続きである。

【図 3】PD-1 および CTLA-4 を標的とする BiS 2、BiS 3、および BiS 5 コンストラクトの同時結合を実証する。トレース A 9 は、BiS 2 PD-1 / CTLA-4 を示し、トレース B 9 は、BiS 3 PD-1 / CTLA-4 を示し、トレース C 9 は、BiS 5 PD-1 / CTLA-4 を示す。

【図 4】PD-1 / CTLA-4 遮断のために提案される機構の概略図を示す。

【図 5】PD-1 および CTLA-4 を標的とする Duet Mab コンストラクトの同時結合を実証する octet 結合アッセイの結果を示す。

【図 6-1】リポータ遺伝子アッセイにおいて PD-1 および CTLA-4 経路を阻害する PD-1 / CTLA-4 二重特異性結合タンパク質を示す。図 6 A は、PD-1 遮断による T 細胞活性化を描く。図 6 B は、CTLA-4 遮断による T 細胞活性化を描く。図 6 C は、PD-1 リポータアッセイの結果を示す。図 6 D は、CTLA-4 リポータアッセイの結果を示す。

40

【図 6-2】図 6-1 の続きである。

【図 7】PD-1 / CTLA-4 Duet Mab および BiS 5 Ab がブドウ球菌エンテロトキシン B (SEB) アッセイにおいて同等の活性を有することを証明する SEB アッセイの結果を示す。

【図 8】SEB アッセイにおいて、アイソタイプおよび親 mAb 対照と比較した PD-1 / CTLA-4 Duet Mab の活性を示す。

【図 9】SEB アッセイにおいて、PD-1 / CTLA-4 Duet Mab と比較した

50

PD-1/CTLA-4 Bis5Abの活性を示す。

【図10-1】混合白血球反応アッセイ (MLR) において、PD-1/CTLA-4 Duet MabおよびBis5Abが同等の活性を有することを示す。図10Aは、アッセイ (n=4ドナー; 2回の独立した実験) の概略図である。

【図10-2】図10-1の続きである。

【図11-1】MLRアッセイにおいて、アイソタイプ対照と比較したPD-1/CTLA-4 Duet Mabの活性を示す (n=2ドナー; 1回の実験)。

【図11-2】図11-1の続きである。

【図12-1】MLRアッセイにおいて、親mAb対照と比較したPD-1/CTLA-4 Duet Mabの活性を示す (n=2ドナー; 1回の実験)。

【図12-2】図12-1の続きである。

【図13-1】MLRアッセイにおいて、競合抗体と比較したPD-1/CTLA-4 Duet Mabの活性を示す (n=2ドナー; 1回の実験)。

【図13-2】図13-1の続きである。

【図14】カニクイザルにおける単回用量薬物動態/薬理学 (PK/PD) 試験の試験設計を示す。

【図15】PD-1/CTLA-4 Duet Mabがカニクイザルにおいて明確な薬理作用 (PD) を示すことを証明する。

【図16】PD-1/CTLA-4 Duet Mab (MED I 5752) およびPD-1/CTLA-4 Bis5Ab (MED I 8500) を投与されたカニクイザルにおけるT細胞依存性抗体応答 (TDAR) を示す。

【図17】安定したCHO細胞が多様なレベルのヒトPD-1および/またはCTLA-4を発現するPD-1/CTLA-4二重特異性分子を試験するためのモデル系を示す。

【図18】PD-1/CTLA-4 Duet Mabが同じ細胞の表面上でPD-1およびCTLA-4と同時に結合することを証明する。

【図19】過剰PD-1を発現する細胞上において、CTLA-4の飽和状態で、抗PD-1およびCTLA-4抗体の組み合わせに対して協同的結合が差異を示すか否かを決定するための実験を示す。

【図20】PD-1およびCTLA-4親モノクローナル抗体が、非標的受容体に対して測定可能な作用を及ぼすことなく、それらの標的受容体に結合してそれを占有することを証明する。

【図21】PD-1/CTLA-4 Duet Mabが、モノクローナル抗体の組み合わせと比較して約250倍低い濃度において、過剰PD-1を発現するCHO細胞上のCTLA-4を飽和させることを証明する。

【図22】PD-1/CTLA-4 Duet Mabが、CTLA-4のみを発現する細胞と比較して約500倍低い濃度において、過剰PD-1を発現するCHO細胞上のCTLA-4を飽和させることを証明する。

【図23-1】PD-1/CTLA-4 Duet Mabが、優先的に同じ細胞の表面上のPD-1およびCTLA-4とシス結合することを証明する。図23BのTremeは、CTLA-4 mAbである。

【図23-2】図23-1の続きである。

【図24】培養T細胞に対するPD-1/CTLA-4 Duet Mabおよび親モノクローナル抗体の結合および内在化を示す。PD-1/CTLA-4 Duet Mabは、トレメリムマブの内在化特性を有する。

【図25】図25A: 内在化アッセイの概略を示す。図25B: PD-1/CTLA-4 Duet Mabが、10倍の過剰PD-1を発現する安定したCHO細胞中のトレメリムマブの内在化特性を帯びていることを証明する。

【図26】PD-L1およびCTLA-4を標的とするBis2、Bis3、およびBis5コンストラクトの同時結合を明らかにする。トレースA11は、Bis2 PD-L1 CTLA-4を示し、トレースB11は、Bis3 PD-L1 CTLA-4を示す。

10

20

30

40

50

し、トレースC11は、BiS5 PD-L1 CTLA-4を示す。

【図27A】PD-1およびTIM3（クローン62、野生型）を標的とするBiS3コンストラクトの同時結合を明らかにする。

【図27B】PD-1およびTIM3（クローン62、野生型）を標的とするDuetMabコンストラクトの同時結合を明らかにする。

【図28-1】細胞殺傷アッセイにおける単一特異性TIM3および二重特異性PD-1/TIM3 PD-1二重特異性コンストラクトの細胞殺傷活性の概要を提供する。図28Aは、18時間時点の同時培養したウェルの明視野画像を示す。抗TIM-3+抗PD1またはTIM-3/PD-1二重特異性フォーマットの組み合わせは、接着細胞の減少およびT細胞のプラスティング（凝集）の増大により評価される通り腫瘍細胞死を増強し、かつT細胞活性化を増大する。図28Bは、黒色腫特異的CD8+T細胞との18時間の同時培養後の腫瘍細胞による生体染色剤取り込みの評価を示す。図28Cは、18時間の同時培養後のIFN γ 分泌を示す。二重特異性コンストラクトは、概して、優れた殺傷活性を示し、DuetMabフォーマットが最も堅固な殺傷活性を発揮する。

【図28-2】図28-1の続きである。

【図29】クローン62の親和性成熟変異体であるTIM3アーム配列を有するPD-1/TIM3 DuetMabコンストラクトの同時結合を明らかにする。

【図30】BiS3、BiS5、およびDuetMabなどのPD-1/TIM3二重特異性抗体と、ヒトTIM3またはヒトPD1を過剰発現するCHO細胞との結合を示す。PD-1およびTIM3発現データを差し込み図に示す。

【図31】活性化T細胞クローン（DMF4）上でのTIM3およびPD-1発現データを示す。

【図32】CMV抗原リコールアッセイからの結果を示し、これは、BiS3、BiS5、およびDuetMabを含むPD-1/TIM3二重特異性抗体がアイソタイプ処置と比較して増強された活性を示すことを証明している（3ドナー（1処置当たり/1ドナー当たり1～2回の反復）、1実験）。

【図33】BiS3、BiS5、およびDuetMabを含むPD-1/TIM3二重特異性抗体が、混合リンパ球反応（MLR）アッセイにおいて8nMを超える濃度でインターフェロン（IFN γ ）を増強したことを証明する（処置/1ドナーペア/2回の独立した実験のうちの1回当たり2～4回の反復）。

【図34】BiS3、BiS5、およびDuetMabを含むPD-1/TIM3二重特異性抗体を用いたPD-1リポータアッセイ（二重細胞系）の結果を示す。全ての二重特異性フォーマットが親LO115IgG1と同様の活性を示す（1処置当たり3～5回の独立した実験の収集/3回の生物学的反復）。

【図35】BiS2およびBiS3 OX40/PD-L1二重特異性分子を用いたoctetアッセイの結果を示す。

【図36-1】BiS2およびBiS3 OX40/PD-L1二重特異性分子を用いたSEBアッセイの結果を示す。

【図36-2】図36-1の続きである。

【図37】BiS2およびBiS3 OX40/PD-L1二重特異性分子を用いたPD-L1リポータアッセイの結果を示す。

【図38】BiS2およびBiS3 OX40/PD-L1二重特異性分子を用いたCMV Agリコールアッセイの結果を示す。

【図39】PD-L1およびOX40を標的とするOX40（SLR）/PD-L1 BiS5コンストラクトの同時結合を実証するoctet結合アッセイの結果を示す。

【図40-1】PD-L1およびOX40を標的とする二重特異性コンストラクトと、ヒトまたはカンイクザルOX40およびPD-L1/B7H1を発現するCHO細胞との結合を示す。

【図40-2】図40-1の続きである。

【図41】フローサイトメトリー（HyperCyt）により測定される、PD-L1お

10

20

30

40

50

よびOX40を標的とする二重特異性コンストラクトと、Jurkat OX40リポーター細胞、NCI H358、CHOK1 B7H1 (PD-L1)/OKT3細胞、およびHEK CD32a細胞との結合を示す。

【図42】OX40/PD-L1二重特異性分子を用いたPD-L1リポーターアッセイの結果を示す。

【図43】OX40/PD-L1二重特異性分子を用いた、HEK CD32a細胞におけるOX40リポーターアッセイの結果を示す。

【図44】OX40/PD-L1二重特異性分子を用いた、CHOK1 PD-L1過剰発現細胞におけるOX40リポーターアッセイの結果を示す。

【図45】OX40/PD-L1二重特異性分子を用いた、腫瘍細胞についてのPD-L1媒介性OX40アゴニズムを示す。

【図46】OX40/腫瘍細胞アッセイの対照において、OX40/PD-L1二重特異性分子を用いたNCI H358 PD-L1 KO細胞にアゴニズムが検出されなかったことを示す結果を示す。

【図47-1】OX40/PD-L1二重特異性分子を用いたSEBアッセイの結果を示す。

【図47-2】図47-1の続きである。

【図48-1】図48A：OX40/PD-L1二重特異性分子を試験するためのTreg抑制アッセイ実験の概略図を示す。図48B-C：二重特異性分子の結合に基づくTreg抑制を示す。

【図48-2】図48-1の続きである。

【図49】OX40/PD-L1二重特異性分子を用いたTreg抑制アッセイの結果を示す。

【図50】OX40/PD-L1二重特異性分子を用いたTreg抑制アッセイの結果を示す。

【図51】OX40/PD-L1二重特異性分子を試験するための混合白血球反応 (MLR) アッセイ実験の設計を示す。

【図52-1】OX40/PD-L1二重特異性分子を用いたMLRアッセイの結果を示す。

【図52-2】図52-1の続きである。

【図53】BiS2およびBiS5 OX40/PD-L1二重特異性分子が、PD-L1またはOX40発現CHO細胞に対するナチュラルキラー (NK) 細胞の抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC) を媒介することを証明する。

【図54】BiS2およびBiS5 OX40/PD-L1二重特異性分子が、PD-L1およびOX40発現CHO細胞に対するNK細胞の抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC) を媒介することを証明する。

【図55】BiS2およびBiS5 OX40/PD-L1二重特異性分子が、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC) において、PD-L1およびOX40発現CHO細胞に対するNK細胞のCD107a動員を増大することを証明する。

【図56】BiS2およびBiS5 OX40/PD-L1二重特異性分子が、活性化同種異系T細胞に対するNK細胞の抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC) を媒介することを証明する。

【図57】BiS5 OX40/PD-L1が、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC) において、活性化同種異系T細胞に対する2つの異なるドナー由来のNK細胞のCD107a動員を増大することを証明する。

【図58】OX40/PD-L1二重特異性分子のPK/PDを比較するための試験設計を示す。

【図59】カニクイザルにおけるPD-L1/OX40二重特異性分子の血清濃度-時間プロファイルの比較を示す。

【図60】PD-L1/OX40二重特異性分子による血清中の可溶性PD-L1の枯渇

10

20

30

40

50

を示す。

【図61-1】PD-1/OX40二重特異性分子の薬力学的データの概要を提供する。ベースラインは、投与前-5日および0日の平均として定義される。

【図61-2】図61-1の続きである。

【図62】PD-1/OX40 BiS2 IgG4 Pモノクローナル抗体 (mAb) の概略図を描く。

【図63】PD-1/OX40 BiS2 mAbの潜在的な作用機構の概略図を描く。

【図64】PD1-HisおよびヒトOX40-Fcに対するPD-1 (LO115)/OX40 BiS2 mAbの2つの異なるロットの同時結合活性を描く。

【図65】図65A: OX40リポーターアッセイの概略図を描く。図65B: PD1 LO115mAb、OX40 mAb、対照mAbおよびPD1 (LO115)/OX40 BiS2 mAbを用いたOX40リポーターアッセイの結果を示す。 10

【図66】図66A: PD-1/PD-1リポーターアッセイの概略図を描く。図66B: PD1 LO115mAb、OX40 mAb、対照mAbおよびPD1 (LO115)/OX40 BiS2 mAbを用いたPD1/PD-1リポーターアッセイの結果を示す。

【図67】PD-1 (LO115)/OX40二重特異性分子のBiS2変異体および対照を用いたSEBアッセイの結果を示す。

【図68】PD-1 (LO115)/OX40二重特異性分子のBiS2変異体および対照を用いたCMV抗原リコールアッセイの結果を示す。 20

【図69】PD-1 (AMP514)/OX40二重特異性分子のBiS2およびBiS3変異体ならびに対照を用いたCMV抗原リコールアッセイの結果を示す。

【図70】カニクイザルにおける単回IV用量投与後のPD1 (LO115)/OX40 BiS2mAbの血清濃度-時間プロファイルを示す。データは、3匹の雄/群の平均±標準偏差を表す。LLOQ (5 ng/mL)を点線で示す。PKC=薬物動態曲線; LLOQ=定量下限。

【図71】カニクイザルにおけるPD-1 (LO115)/OX40 BiS2mAbの単回IV投与後のKi67陽性CD4+およびCD8+メモリT細胞の割合(%)を示す。データは、3匹の雄/群の平均±標準偏差を表す。左側パネルAは、CD4+メモリT細胞を示し、右側パネルは、CD8+メモリT細胞を示す。IV=静脈内。 30

【図72】カニクイザル血清中のPD-1/OX40定量の代表的な標準曲線を示す。

【図73-1】様々なpH値において、異なるBiSフォーマット(「BiS4」と比較した本明細書に開示の二重特異性結合タンパク質(「BiS5」)の例示的なDSCサーモグラムを提供する。図73Aは、BiS4の熱安定性に対するpH値の作用を示す。図73Bは、BiS5の熱安定性に対するpH値の作用を示す。図73Cは、T_{onset}、T_{m1}、T_{m2}、およびT_{m3}を含む、BiS4の代表的な曲線当てはめDSCサーモグラムを描く。図73Dは、T_{onset}、T_{m1}、T_{m2}、およびT_{m3}を含む、BiS5の代表的な曲線当てはめDSCサーモグラムを描く。図73Eは、BiS4およびBiS5フォーマットについて、T_{onset}、T_{m1}、T_{m2}、およびT_{m3}に対するpHの作用を表すプロットを描く。 40

【図73-2】図73-1の続きである。

【図74-1】40℃で4週間の保存前および保存後のpH7.5でのサンプルのHPSEC分析を描く。図74Aは、熱ストレス前および熱ストレス後のBiS4およびBiS5のSECクロマトグラムのプロットを重ねて示し、実線は、ゼロ時点で(ストレスなし)のBiS4およびBiS5サンプルに対応し、点線は、40℃で4週間インキュベートした(ストレスを加えた)BiS4およびBiS5サンプルに対応する。図74Bは、ゼロ日目および40℃で4週間後に測定した、BiS4およびBiS5の様々な種(モノマー、フラグメント、および凝集体)に対するpH7.5の作用を表す棒グラフを提供する。

【図74-2】図74-1の続きである。 50

【図75】BiS4（三角トレース）およびBiS5（丸トレース）について、40℃での加速および短期保存安定性に対するpH7.5の作用を示す動態プロットを提供する。図75Aは、4週間にわたってHP-SECにより測定した残留モノマーのパーセンテージを示す。図75Bは、4週間にわたってHP-SECにより測定したフラグメント化のパーセンテージを示す。図75Cは、4週間にわたってHP-SECにより測定した凝集のパーセンテージを示す。表示するデータは、単一バイアル分析からのものである。

【図76】BiS4（三角）およびBiS5（丸）のpH-速度プロフィールプロットを描く。図76Aは、40℃でのモノマー喪失の速度に対する様々なpH条件の作用を示す。図76Bは、40℃でのフラグメント化の速度に対する様々なpH条件の作用を示す。図76Cは、40℃での凝集の速度に対する様々なpH条件の作用を示す。

【図77-1】BiS4およびBiS5フラグメント化のさらなる分析を描く。図77Aは、pH7.5および40℃で（時間=0）いずれの分子も明らかなフラグメント化を呈示しないことを示す。図77Bは、図77Aと同じ条件下であるが、40℃で2週間の保存後、BiS4について明らかなフラグメント化が、BiS5についてわずかなフラグメント化が観察されることを示す。

【図77-2】図77-1の続きである。

【図78】pHの関数としてのBiS4およびBiS5フラグメント化（左側パネル）および凝集（右側パネル）の分析を描く。いずれのフォーマットも低い（5.5）pHでフラグメント化および凝集を低減したが、BiS5の方が、いずれのpH値でもフラグメント化および凝集の両方について優れた性能を有する。

【図79】コンストラクト（左側パネル）A、B、CおよびD、ならびに（右側パネル）E、F、GおよびHについて本明細書に開示されるいくつかのBiS5二重特異性結合タンパク質のDSCサーモグラムを描く。コンストラクトAおよびEは、IS-RTPにscFvを含み；BおよびFは、AK-GQPにscFvを含み；CおよびGは、S-NGにscFvを含み；DおよびHは、SN-GにscFvを含む。コンストラクトA、B、CおよびDのscFvは、2F4であり（IgGは、LC10である）、E、F、GおよびHのscFvは、LC10である（IgGは、2F4である）。様々なT_M値が下記のドメインに関連する：T_M1=CH2/scFv；T_M2=Fab；T_M3=CH3。

【図80】本明細書に開示する二重特異性結合タンパク質（コンストラクトDおよびH）とのFcRn結合に関する代表的なデータセットを示す。CH2-CH3ドメイン（すなわち、ISTRPループ内）のscFv位置は、FcRn結合活性に作用をもたらし得る。

【図81】本明細書に開示する二重特異性結合タンパク質（FcγRIIIa-158Vを含むコンストラクトE、G、およびH）とのFcγR結合に関する代表的なデータセットを示す。差し込み図は、FcγRIIIa-158V注射時に再標準化した主要図と同じデータを表す。全てのコンストラクトがFcγRに結合することができたが、scFvドメインの位置に基づく親和性に観察可能な差があった。

【図82】インタクトなIS RTPループが例示的な二重特異性結合コンストラクト（たとえば、AおよびE）のFcRn結合に重要であることを証明する。N3ループの導入は、IS RTPループの分断を補償しない（BiS5E+N3）。IgG1-Fcに挿入されたN3ループに導入されたscFvにより、IgGはFcRnに結合不可能になる。x軸の時間は、秒で測定される。

【図83】BiS1、BiS2、BiS3、BiS4、およびBiS5コンストラクト各々の一般的な概略構造フォーマットを描く。「k1」および「k2」の呼称は、実施例3で論じる動態分析で使用されるフラグメント化パターンを示す。

【図84】pHの関数としてのBiS1、BiS2、BiS3、BiS4、およびBiS5各々のフラグメント化速度を示す。

【図85】pHの関数としてのBiS1、BiS2、BiS3、BiS4、およびBiS5各々の凝集速度を示す。

【図86】pHの関数としてのBiS1、BiS2、BiS3、BiS4、およびBiS

10

20

30

40

50

5 各々のモノマー喪失速度を示す。

【図87】BiS1、BiS2、BiS3、BiS4、およびBiS5各々についてのフラグメント化パターンおよびHPSECクロマトグラムのピークとの一致の図を描く。

【図88】還元条件下でのフラグメント化パターンの代表的な分析を描く。

【図89】還元および非還元条件下でのBiS5の構造配置を描く。

【図90】SEBアッセイフォーマットを描く。

【発明を実施するための形態】

【0049】

引き続き本開示をさらに詳細に記載する前に、本開示は、特定の組成物またはプロセスステップに限定されるものではなく、従って異なってもよいことを理解されたい。本明細書および添付の特許請求の範囲に使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、文脈上明らかに他の意味に解すべき場合を除き、複数の意味を含むことに留意しなければならない。

【0050】

他に記載がない限り、本明細書で使用する技術用語および科学用語は、全て本発明が関連する技術分野の当業者が一般に理解しているのと同じ意味を有する。たとえば、Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; および Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press は、当業者にとって本発明に使用される多くの用語の一般的な辞書となる。

【0051】

本明細書においてアミノ酸は、その一般に知られる3文字記号またはIUPAC-IUB生化学命名委員会(Biochemical Nomenclature Commission)により推奨される1文字記号で示すことがある。ヌクレオチドも、同様に、その一般的に認められた1文字記号で示すことがある。

【0052】

抗体の可変ドメイン、相補性決定領域(CDR)およびフレームワーク領域(FR)のアミノ酸の番号付けは、他に記載がない限り、Kabata et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)に記載されるKabataの定義に従う。この番号付け体系を使用すると、実際の直鎖状アミノ酸配列は、可変ドメインのFRもしくはCDRの短縮またはFRもしくはCDRへの挿入に対応して、より少ないアミノ酸または追加のアミノ酸を含むことができる。たとえば、重鎖可変ドメインは、H2の残基52の後の1個のアミノ酸の挿入(Kabataによれば残基52a)、および重鎖FR残基82の後に挿入された残基(たとえば、Kabataによれば残基82a、82bおよび82cなど)を含むことができる。残基のKabataの番号付けは個々の抗体に対して、抗体の配列と「標準的な」Kabata番号が付けられた配列との相同性領域でアライメントを行うことにより決定することができる。フレームワーク残基の最大のアライメントには、Fv領域に使用される、この番号付け体系の「スペーサー」残基の挿入が必要とされることが多い。さらに、任意の特定のKabata部位番号における個々の特定の残基の種類は、種間の相違または対立遺伝子の相違のため抗体鎖によって異なることもある。

【0053】

本明細書で使用する場合、「抗体」という用語は、免疫グロブリンとも呼ばれ、モノクローナル抗体(全長モノクローナル抗体を含む)、ポリクローナル抗体、少なくとも2つ

10

20

30

40

50

の異なるエピトープ結合フラグメントから形成される多重特異性抗体（たとえば、多重特異性抗体、たとえば、その全体を本明細書に援用する国際公開第2009/018386号パンフレット、国際出願PCT/米国特許出願公開第2012/045229号明細書）、BiSAb、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ化抗体、一本鎖Fv（scFv）、一本鎖抗体、単ドメイン抗体、ドメイン抗体、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、所望の生物活性を示す抗体フラグメント（たとえば、抗原結合部分）、ジスルフィド結合Fv（dsFv）、および抗イディオタイプ（抗Id）抗体（たとえば、本発明の抗体に対する抗Id抗体など）、イントラボディ、ならびに上記のいずれかのエピトープ結合フラグメントを包含する。特に、抗体は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性なフラグメント、すなわち、少なくとも1つの抗原結合部位を含む分子を含む。抗体は、抗体またはその一部とのペプチド融合体、たとえばFcドメインとの融合タンパク質も含む。免疫グロブリン分子は、どのようなアイソタイプ（たとえば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY）、サブアイソタイプ（たとえば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2）またはアロタイプ（たとえば、Gm、たとえばG1m（f、z、aまたはx）、G2m（n）、G3m（g、bまたはc）、Am、EmおよびKm（1、2または3））であってもよい。抗体は、任意の哺乳動物、以下に限定されるものではないが、ヒト、サル、ブタ、ウマ、ウサギ、イヌ、ネコ、マウスなど、または他の動物、たとえばトリ（たとえば、ニワトリ）に由来してもよい。

10

【0054】

20

CTLA-4

細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（CTLA-4）は、活性化T細胞に発現され、CD28媒介性T細胞活性化後にT細胞応答を阻止する共阻害剤として作用する。CTLA-4は、TCRエンゲージメント後、ナイーブおよびメモリT細胞の早期活性化の大きさを調節すると共に、抗腫瘍免疫および自己免疫の両方に影響を及ぼす中心的な阻害経路の一部であると考えられる。CTLA-4は、T細胞にのみ発現され、そのリガンドCD80（B7.1）およびCD86（B7.2）の発現は、主として、抗原提示細胞、T細胞、および他の免疫媒介細胞に限定される。CTLA-4シグナル伝達経路を遮断するアンタゴニスト抗CTLA-4抗体は、T細胞活性化を増強することが報告されている。そのような抗体の1つ、イピリムマブは、転移性黒色腫の治療のために2011年にFDAによって承認された。感染症および腫瘍を治療し、養子免疫応答をアップモジュレートするための抗CTLA-4抗体の使用が提案されている（米国特許第6,682,736号明細書；同第7,109,003号明細書；同第7,132,281号明細書；同第7,411,057号明細書；同第7,824,679号明細書；同第8,143,379号明細書；同第7,807,797号明細書；同第8,491,895号明細書；同第8,883,984号明細書；ならびに米国特許出願公開第20150104409号明細書を参照されたい；これらは、その全体が参照により本明細書に援用される）。

30

【0055】

PD-L1

プログラム死リガンド1（PD-L1）も、T細胞活性化の制御に関与する受容体およびリガンドの複合系の一部である。正常組織では、PD-L1は、T細胞、B細胞、樹状細胞、マクロファージ、間葉系幹細胞、骨髄由来肥満細胞、ならびに様々な非造血細胞に発現される。その正常機能は、その2つの受容体：プログラム死1（別称：PD-1もしくはCD279）およびCD80（別称：B7-1もしくはB7.1）との相互作用により、T細胞活性化と耐容性との間で平衡を調節することである。PD-L1は、腫瘍によっても発現され、多くの部位で作用して、腫瘍が宿主免疫系による検出および排除から逃れることを促進する。PD-L1は、多様な癌において高頻度で発現される。いくつかの癌では、PD-L1の発現は、低い生存率および予後不良に関連している。PD-L1とその受容体との相互反応を阻止する抗体は、PD-L1依存性免疫抑制効果を軽減し、抗腫瘍T細胞の細胞傷害性活性をインビトロで増強することができる。デュルバルマブ（D

40

50

urv al mab) は、PD-1 および CD80 受容体の両方と PD-L1 との結合を阻止することができる、ヒト PD-L1 に対するヒトモノクローナル抗体である。感染症および腫瘍を治療し、養子免疫応答を増大するための抗 PD-L1 抗体の使用が報告されている（その全体を参照により本明細書に援用する米国特許第 8, 779, 108 号明細書および同第 9, 493, 565 号明細書を参照されたい）。

【0056】

PD-1

プログラム死-1（「PD-1」）は、T細胞調節物質の延長された CD28/CTLA-4 ファミリーの約 31 kD の I 型膜タンパク質メンバーである（Ishida, Y. et al. (1992) Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death, "EMBO J. 11:3887-3895 を参照されたい。

10

【0057】

PD-1 は、活性化 T 細胞、B 細胞、および単球に発現される（Agata, Y. et al. (1996) "Expression of the PD-1 Antigen on the Surface of Stimulated Mouse T and B Lymphocytes," Int. Immunol. 8 (5):765-772; Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation and Anti-Tumor Immunity," Semin. Cancer Biol. 17 (4):288-298)。PD-1 は、PD-L1 または PD-L2 の結合による活性化後に免疫系のダウンレギュレーションの原因となる受容体であり（Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation and Anti-Tumor Immunity," Semin. Cancer Biol. 17 (4):288-298)、細胞死誘導物質として作用する（Ishida, Y. et al. (1992) "Induced Expression of PD-1, A Novel Member of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death," EMBO J. 11:3887-3895; Subudhi, S. K. et al. (2005) "The Balance of Immune Responses: Costimulation Verse Coinhibition," J. Molec. Med. 83:193-202)。このプロセスは、多くの腫瘍で PD-L1 の過剰発現を介して利用され、免疫応答の抑制を招く。

20

30

【0058】

PD-1 は、腫瘍学における免疫媒介療法のために十分に検証された標的であり、とりわけ黒色腫および非小細胞肺癌（NSCLC）の治療の臨床試験から有望な結果をもたらしている。PD-1/PD-L1 相互作用の拮抗的阻害は、T細胞活性化を高め、宿主免疫系による腫瘍細胞の認識および排除を増強する。感染症および腫瘍を治療し、養子免疫応答を増大するための抗 PD-1 抗体の使用が提案されている（米国特許第 7, 521, 051 号明細書；同第 7, 563, 869 号明細書；同第 7, 595, 048 号明細書を参照されたい）。

40

【0059】

OX40

OX40 (CD134; TNFRSF4) は、主として、活性化 CD4⁺ および CD8⁺ T 細胞、調節 T (Treg) 細胞およびナチュラルキラー (NK) 細胞に見出される腫瘍壊死因子受容体である（Croft et al., 2009, Immunol Rev. 229:173-91)。OX40 は、1 つの既知内在性リガンド、OX40 リガンド (OX40L; CD152; TNFSF4) を有し、これは、三量体の形態で存在し、OX40 をクラスター化することができ、それにより T 細胞内に強力な細胞シグナル伝達

50

事象をもたらす。同上。活性化CD4⁺およびCD8⁺T細胞上でのOX40によるシグナル伝達は、サイトカイン産生増大、グランザイムおよびペルホリン放出、ならびにエフェクターおよびメモリT細胞プールの拡大をもたらす(Jensen et al., 2010, Semin Oncol. 37:524-32)。加えて、Treg細胞でのOX40シグナル伝達は、Tregの拡大を阻害し、Tregの誘導を停止すると共にTreg抑制機能を阻害する(Voo et al., 2013, J Immunol. 191:3641-50; Vu et al., 2007, Blood. 110:2501-10)。

【0060】

免疫組織化学研究および早期フローサイトメトリー分析により、OX40が、多様なヒト癌に浸潤するT細胞に発現されることが証明された(Baruah et al., 2011, Immunobiology 217:668-675; Curti et al., 2013, Cancer Res. 73:7189-98; Ladanyi et al., 2004, Clin Cancer Res. 10:521-30; Petty et al., 2002, Am J Surg. 183:512-8; Ramstad et al., 2000, Am J Surg. 179:400-6; Sarff et al., 2008, Am J Surg. 195:621-5; discussion 625; Vetto et al., 1997, Am J Surg. 174:258-65)。特定の理論に拘束されることは意図しないが、腫瘍浸潤リンパ球でのOX40発現は、数種のヒト癌におけるより長期の生存と関連しており、これは、OX40シグナルが抗腫瘍免疫応答の確立において役割を果たし得ることを示唆している(Ladanyi et al., 2004, Clin Cancer Res. 10:521-30; Petty et al., 2002, Am J Surg. 183:512-8)。

【0061】

多様な非臨床マウス腫瘍モデルにおいて、抗体およびOX40リガンド融合タンパク質を含むOX40のアゴニストの使用が成功しており、有望な結果をもたらしている(Kjaergaard et al., 2000, Cancer Res. 60:5514-21; Ndhlovu et al., 2001, J Immunol. 167:2991-9; Weinberg et al., 2000, J Immunol. 164:2160-9)。OX40によるT細胞の同時刺激は、場合により持続性の抗腫瘍活性を促進し、後の腫瘍攻撃に対して長時間持続する防御をもたらした(Weinberg et al., 2000, J Immunol. 164:2160-9)。Treg細胞阻害およびエフェクターT細胞の同時刺激は、OX40アゴニストの腫瘍成長阻害に必要であることが明らかにされた(Piconese et al., 2008, J Exp Med. 205:825-39)。OX40アゴニスト療法の抗腫瘍効果を増強するために、ワクチン、化学療法、放射線療法、および免疫療法との併用により、多くの戦略および技術が模索されている(Jensen et al., 2010, Semin Oncol. 37:524-32; Melerio et al., 2013, Clin Cancer Res. 19:997-1008)。感染症および腫瘍を治療し、養子免疫応答をアップモジュレートするための抗OX40抗体の使用が提案されている(その全体を参照により本明細書に援用する米国特許出願公開第20160137740号明細書を参照されたい)。

【0062】

TIM3

T細胞阻害性受容体Tim-3 (T細胞免疫グロブリンおよびムチンドメイン含有3)は、IFN γ 産生CD4⁺ヘルパー1 (Th1) およびCD8⁺T細胞傷害性1 (Tc1) T細胞に発現されることから、抗腫瘍免疫の調節において役割を果たす。これは、当初、特にTh1およびTc1 T細胞応答の持続時間および大きさを制限するために機能する免疫チェックポイント受容体として作用するT細胞阻害性受容体として同定された。さらなる研究により、Tim-3経路がPD-1経路と協同して、癌におけるCD8⁺T

細胞中に重度の機能不全表現型の発生を促進し得ることが特定された。これは、特定の癌の調節T細胞（Treg）でも発現されている。いくつかの癌で免疫抑制されている主要な免疫細胞集団へのTIM3経路の関与を考慮すれば、これは、癌免疫療法の魅力的な候補となる。Anderson, A. C., Cancer Immunol Res., (2014) 2: 393-398; および Ferris, R. L., et al., J Immunol. (2014) 193: 1525-1530を参照されたい。

【0063】

A. 二重特異性結合タンパク質

単一の結合ドメインに対する特異性を有する分子に複数の結合部位を付加すると、分子の能力（たとえば、治療能、診断能など）を大きく高めることができる。たとえば、二重特異性抗体は、同じ標的分子の2つ以上の領域に結合して、標的の1つのエピトープのみに結合する単特異性ポリペプチドより大きい特異性を与えることができる。あるいは、二重特異性抗体は、複数の標的分子、たとえば複合体に存在する標的、または封鎖および／またはクラスター形成が望ましい標的に結合することができる。第3のシナリオでは同じ二重特異性抗体が、その標的分子の局在および／または発現に応じて、いつでも異なる機能を発揮することができる。

【0064】

本明細書に記載されるのは、新規な結合タンパク質である。これらの新規な結合タンパク質のそうした1つの構造を「Duet Mab」と呼ぶ。Duet Mabは、下記の基本構造を有する：修飾重鎖（ここで、修飾重鎖のCH1領域は、非システインアミノ酸へのネイティブシステインの置換、およびシステインアミノ酸へのネイティブ非システインアミノ酸の置換を有する）；対応する修飾軽鎖（ここで、修飾軽鎖のCL領域も、非システインアミノ酸へのネイティブシステインの置換、およびシステインアミノ酸へのネイティブ非システインアミノ酸の置換を有する）；第2の重鎖を有する第2のFc領域；および対応する第2の修飾軽鎖を有するFc領域（ここで、修飾重鎖は、対応する修飾軽鎖に直接連結され、個別の標的結合アーム上において、第2の重鎖は、第2の対応する軽鎖に直接連絡されており、システインアミノ酸へのネイティブ非システインアミノ酸の置換によって得られる修飾重鎖の置換システイン、およびシステインアミノ酸へのネイティブ非システインアミノ酸の置換によって得られる対応する修飾軽鎖の置換システインは、ジスルフィド結合を形成することができる）。Duet Mabに関する開示は、たとえば、米国特許第9,527,927号明細書に見出すことができ、これは、全体として参照により本明細書に援用される。

【0065】

これらの新規な結合タンパク質の別の例示的な構造は、「BiSAb」または「BiSAb s」と呼ばれる。例示的なBiSAbの概略図、ならびに特定のBiSAbの具体的な例を本明細書に提供する。さらに一般的には、BiSAbは、2つの結合ユニットを含有するポリペプチドであり、これらの各々がエピトープに結合する（たとえば、結合ユニット1は、第1のエピトープに結合し、結合ユニット2は、第2のエピトープに結合する）。基本的なBiSAbは、2つのエピトープの各々に結合するために二価である（たとえば、ポリペプチドは、2つの結合ユニット1（「BD1」または「BU1」）と2つの結合ユニット2（「BD2」または「BU2」）を含む）。従って、結合ユニット1および2が異なるエピトープに結合する場合、BiSAbは、従来の二重特異性抗体の多重特異性と、従来の抗体分子の二価性とを有する。結合ユニット1および2が同じエピトープに結合する実施形態では、BiSAbは、通常の抗体の単一特異性を有するが、四価である。結合ユニットに加えて、BiSAbは、リンカーポリペプチドおよびFc部分も含む。本開示は、BiSAbおよびBiSAbコアを含むタンパク質などの広範な二重特異性結合タンパク質の組に関し、これらのタンパク質は、免疫応答をモジュレートする分子をターゲティングする。一般に、本明細書に記載の新規な結合タンパク質プラットフォームおよび例示的な二重特異性結合タンパク質（BiSAb）は、結合ユニット／ドメイン、リンカーポリペプチドおよびFc部分を含む。本開示は、こうしたBiSAbをコード

する核酸分子、ならびにこうした核酸を含み、こうしたB i S A bを生成および使用する方法に用いることができるベクターおよび宿主細胞も提供する。B i S A b、B i S A bコアを含む結合タンパク質、およびB i S A bの様々な部分は、本明細書においてさらに詳細に記載される。

【0066】

いくつかの態様では、B i S A bは、特異性結合タンパク質（すなわち抗体）に由来する2つの重鎖－軽鎖対を含んでよく、ここで、重鎖および軽鎖は、それぞれ可変領域（たとえば、V LおよびV H）を含み、これらは、一緒に第1結合ユニットを形成し、重鎖は、それぞれ第2の結合ユニット（たとえば、F cまたはF a bに結合したs c F vドメイン）をさらに含む。第1および第2の結合ユニットが異なるエピトープに結合する場合、各重鎖－軽鎖対は、二重特異性であり、エピトープの各々について2つの対が共に二価である。第1および第2の結合ユニットが同じエピトープに結合する場合、各重鎖－軽鎖対は、単一特異性であり、2つの対がそのエピトープについて共に四価である。いくつかの態様において、2つの重鎖－軽鎖対は同一である。いくつかの態様では、2つの重鎖－軽鎖対は同一ではない。

10

【0067】

特定の実施形態では、B i S A bのドメインは、既知免疫グロブリンドメインを基材としてもよい。モノクローナル抗体（m A b）などの免疫グロブリン分子は、診断薬および治療薬として広く使用されており、m A bの結合フラグメントを作製する方法は、当該技術分野で公知である。あらゆる免疫グロブリン分子などのモノクローナル抗体は、重鎖および軽鎖ペプチドサブユニットから構成され、これらは、それぞれ結合特異性（可変ドメイン）およびアイソタイプ（定常ドメイン）を付与する可変および定常ドメインを含む。

20

【0068】

本明細書に開示するB i S A bは、一般的な抗体と同様の全体的構造を有するが、F a bドメイン内の位置で結合され、F a bドメインから離れた位置およびヒンジまたはF c領域内（たとえば、C H 2、C H 3、もしくはC H 4領域またはC H 2－C H 3境界面などのこうした領域の境界面において）で結合される追加の結合ユニットの存在によって区別可能である。従って、単一のエピトープに結合するために二価である通常の抗体と異なり、B i S A bは、2つのエピトープに結合するために二価である。しかしながら、本明細書に記載するように、B i S A bは、C 1 qおよびF c R nと結合する能力ならびにF c γ受容体と結合する能力（たとえば、抗体および補体依存性細胞傷害性を媒介する能力を示す）など、通常の抗体の多くの望ましい特性を依然として維持し得る。

30

【0069】

本明細書に記載する結合ドメインは、F a b、F（a b'）₂、F a b'、s c F v、d i－s c F v、s d A bフラグメントなどのm A b分子の部分のみを含有する抗原結合フラグメントを含んでもよい。なぜなら、これらのフラグメントは、診断薬または治療薬として有用であることが判明したためである。加えて、可変ドメインにおける特定の残基は、抗体および抗体フラグメントの結合特異性および／または安定性を改善するために改変することもできる。非ヒト抗体の領域を「ヒト化」とすると共にm A bの免疫原性を低減するために、抗原結合に直接関与しない他の残基を置換することができる。

40

【0070】

B i S A bは、従来の抗体と異なり、たとえば2つの異なるエピトープへの結合に対して二価（または1つのエピトープへの結合に対して四価）であるが、B i S A bの多くの部分は、従来の抗体部分に由来するまたは類似する。本明細書に記載のB i S A bには、当該技術分野において公知のどのようなm A bドメインおよび／またはフラグメントを使用してもよい。特に、B i S A bは、F a bフラグメントおよび／もしくはs c F vフラグメントまたはこれらの変異体を含んでもよい。例示的かつ非限定的なs c F vの変異体として、タンデムジ－s c F v、タンデムトリ－s c F v、ダイアボディおよびトリボディまたはトリアボディがあるが、これに限定されるものではない。

【0071】

50

本開示は、全般的に、新規な結合タンパク質に関し、B i S A bが実例である。別の例には、B i S A bコアのほか、1つまたは複数の追加の結合ユニットを含む結合タンパク質および／または伸長型B i S A bコアを含む結合タンパク質がある。B i S A bまたはB i S A bの特徴を本明細書に記載するときは、そうした記載が本開示の新規な結合タンパク質に全般的に当てはまるものであり、そうした結合タンパク質が2つの結合ユニットまたは3つ以上の結合ユニットを含むかどうかに関係ないことを理解すべきである。従って、B i S A bという用語は、本明細書に記載される結合タンパク質を例示するものであり、文脈上許容される場合、B i S A bに関する任意のそうした言及は、B i S A bコアを含む結合タンパク質を説明するために使用されることがある。

【0072】

新規なB i S A b構造プラットフォーム

一態様では、本開示は、一般的に図1A～1Fの概略図によって示される構造プラットフォームを有するB i S A b結合タンパク質を提供する。これらの図は、例示的であり、従って追加的残基間への挿入も、開示される結合タンパク質の範囲に含まれる。図1A～1Cは、P y M O Lを用いてモデル化されたI g G 1のC H 2－C H 3境界面における抗体のF c領域を描き、本開示のいくつかの例示的なB i S A bを示す。3つの表面露出ループがC H 2－C H 3境界面またはその付近で同定され、これらは、I g Gまたは第2の結合部分の構造的完全性または安定性を損なうことなく、第2の結合部分（たとえば、s c F v）の挿入に耐えることができる可能性があった。図1Aは、C H 2－C H 3境界面付近のC H 2領域内で同定された1つのそうした代表的ループI S R T P（配列番号39）の概略図である。図1Dも代表的コンストラクトI S－s c F v－R T Pを示し、ここで、s c F vは、I S R T PループのSとRとの間に挿入されている。図1Bは、C H 2－C H 3境界面で同定された代表的ループA K G Q P（配列番号40）の概略図である。図1Eは、代表的コンストラクトA K－s c F v－G Q Pを示し、ここで、s c F vは、A K G Q PループのKとGとの間に挿入されている。図1Cは、C H 2－C H 3境界面下流のC H 3領域内で同定された代表的ループS N Gの概略図である。図1Fも代表的コンストラクトS－s c F v－N Gを示し、ここで、s c F vは、S N GループのSとNとの間に挿入されている。本明細書に記載する実施例は、S N－s c F v－Gのように配向されたコンストラクトの説明を提供するが、この場合、s c F vは、S N GループのNとGとの間に挿入されている。

【0073】

従って、本開示の一態様は、2つの同じ重鎖－軽鎖対を含むB i S A bに関し、ここで、各重鎖－軽鎖対は、二重特異性であり、2つの同一の対は、各エピトープについて共に二価である。各重鎖－軽鎖対は、第1のエピトープに結合するF a bドメインを含み得る結合ドメイン（B D）（結合ユニット1）、第2のエピトープに結合する第2の結合ドメイン（B D 2）（またはたとえばs c F vであってもよい結合ユニット2）、およびF c領域を含む。いくつかの実施形態では、第2の結合ドメインは、F a bドメインと結合していてもよい。いくつかの実施形態では、B i S A bのF c領域は、第2のエピトープに結合する第2の結合ドメイン（B D 2）（結合ユニット2；図1D～1Fではs c F vとして描かれる）と結合していてもよい。

【0074】

いくつかの実施形態では、本開示は、2つのキメラ重鎖を含む一般的なプラットフォーム構造を有するB i S A bを提供し、これらは、それぞれ重鎖可変領域（V H 1）、重鎖定常領域（C H 1）、ヒンジまたはポリペプチドリンカー領域、C H 2ドメインとC H 3ドメインとを含むF c領域を含み、ここで、任意選択的に、片側または両側がポリペプチドリンカー（L 1および／またはL 2）によりフランキングされている第2の結合ドメイン（B D 2）は、（i）C H 2領域、（i i）C H 2およびC H 3領域、または（i i i）C H 3領域の順でF c領域内の溶媒曝露ループと結合されている。本開示のこの態様のB i S A bも2つの通常の抗体軽鎖を含み、これらは、それぞれ軽鎖可変領域（V L 1）と軽鎖定常領域（C L）とを含み、第1の結合ドメイン（B D 1）の一部を形成する。図

10

20

30

40

50

1 D～1 Fに示す特定のB i S A bの結合ドメイン（B D 2）は、s c F vである。

【0075】

図1 D～1 Fは、本明細書でB i S A b「コア」と呼ばれることもあるB i S A bの有用な概略図を提供する。図1 Dに示すように、ポリペプチド鎖は、V H 1ドメイン、C H 1ドメイン、ヒンジ／リンカー、部分的なN末端C H 2ドメイン、任意選択的なリンカー（本明細書ではL 1または第1のポリペプチドリンカーと呼ばれる）、結合ユニット2（s c F vのV L 2およびV H 2など）、別の任意選択的なリンカー（たとえば、L 2または第2のポリペプチドリンカー）、残りのC末端C H 2ドメイン、およびC H 3ドメインを有する重鎖を含む。この重鎖は、代替的な結合タンパク質および／または従来の軽鎖領域を有するB D 2を含み得ることから、本明細書でキメラ重鎖と呼ばれる。B i S A bは、2つのこうしたキメラ重鎖を含み、これらは同一でもまたは異なってもよい。結合ユニット1の可変重鎖ドメイン（V H）はV H 1という点に留意されたい。ある態様では、これは、第1のエピトープに結合するF a bの可変重鎖である。同様に、結合ユニット1の可変軽鎖ドメイン（V L）はV L 1という。ある態様では、これは、第1のエピトープに結合するF a bの可変軽鎖である。一方、結合ユニット2が第2のエピトープに結合するs c F vである態様では、結合ユニット2のドメインは、V H 2およびV L 2など数字「2」で示す。

10

【0076】

同様に、ポリペプチド鎖は、図1 Eに示すように、V H 1ドメイン、C H 1ドメイン、ヒンジ／リンカー、C H 2ドメイン、任意選択的なリンカー（本明細書ではL 1または第1のポリペプチドリンカーと呼ばれる）、結合ユニット2（s c F vのV L 2およびV H 2など）、別の任意選択的なリンカー（たとえば、L 2または第2のポリペプチドリンカー）、およびC H 3ドメインを有する重鎖を含む。この実施形態では、B i S A bは、C H 2およびC H 3領域の境界面における配列でF cと結合したs c F vとして示される第2結合ドメインを含む。

20

【0077】

ポリペプチド鎖は、図1 Fに示すように、V H 1ドメイン、C H 1ドメイン、ヒンジ／リンカー、C H 2ドメイン、部分的C H 3ドメイン、任意選択的なリンカー（本明細書ではL 1または第1のポリペプチドリンカーと呼ばれる）、結合ユニット2（s c F vのV L 2およびV H 2など）、別の任意選択的なリンカー（たとえば、L 2または第2のポリペプチドリンカー）、およびC H 3ドメインを有する重鎖を含む。

30

【0078】

これらの実施形態では、B i S A bは、典型的に、キメラ重鎖配列における典型的または修飾抗体ヒンジ領域を含む。ヒンジ領域を含むアミノ酸配列の非限定的例として、E P K S C D K T H T C P P C P（配列番号44）；E P K S C D K T（配列番号45）；E P K S C G K T（配列番号46）；E P K S C（配列番号47）が挙げられる。

【0079】

本明細書に開示するいくつかのB i S A b分子の特定の構造プラットフォームに関する態様について一般的なフォーマットを記載してきたが、開示されるB i S A bの様々な部分および例示的な機能特性を以下にさらに詳細に説明する。他の実施形態では、本開示は、本明細書ならびにその各々を参照により本明細書に援用する他の開示（たとえば、米国特許出願公開第20090155275号明細書および米国特許第9,580,509号明細書を参照されたい）に簡潔に記載される代替的な構造フォーマットおよび配置を含む他のB i S A b結合タンパク質を考慮しかつ提供する。

40

【0080】

1. 結合ユニット

本開示のB i S A bは、少なくとも2つの結合ユニットまたは結合ドメイン（結合ユニット／ドメイン1および結合ユニット／ドメイン2）を含む。ある態様では各結合ユニットは、同じ標的分子上にある異なるエピトープまたは異なる標的上のエピトープを問わず、異なるエピトープに結合する。B i S A bの結合ユニットは、それぞれ対として存在す

50

る（２つの結合ユニット１および２つの結合ユニット２が存在する）ため、B i S A bは各エピトープに対して二価の結合を示す。本明細書の教示から、各結合ユニットが同じエピトープに結合する場合、B i S A bはエピトープに対して四価の結合を示すことが理解されよう。

【００８１】

ある態様では、第１の結合ユニットはF a bフラグメント、たとえば通常のモノクローナル抗体のF a bフラグメント、または可変軽鎖（V L １）、定常軽鎖（C L）、可変重鎖（V H １）および定常重鎖部分（C H １）を含む組換え技術によって作製された抗原結合フラグメントである。任意選択的に、F a bの軽鎖および重鎖は、たとえば、好適な抗体ヒンジ領域などの１つまたは複数のジスルフィド結合を介して相互に連結してもよい。F a bは、第１のエピトープに結合する。

10

【００８２】

ある態様では、F a bは、通常のマウス、ヒト化、またはヒト抗体などの通常のモノクローナル抗体の配列に由来するか、またはそれに基づく。ある態様では、通常のモノクローナル抗体の配列に由来するか、またはそれに基づくF a bを含有するB i S A bは、通常の抗体の１つまたは複数の機能的活性を保持する（たとえば、機能的活性の少なくとも８０％以上（８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、９９％または１００％）を保持する）。たとえば、ある態様では、こうしたF a bを含有するB i S A bは、通常の抗体の、抗原に対する親和性、阻害活性、免疫系モジュレーション活性、免疫応答の活性化もしくは誘導、および／または細胞（たとえば、癌細胞）殺傷活性の１つまたは複数

20

【００８３】

ある態様では、本開示のB i S A bは、結合ユニット２を含み、結合ユニット２は、第２のエピトープに結合する結合ドメインを含む。結合ユニット２（または結合ドメイン２（B D ２））は、任意の好適な戦略を用いてB i S A bと結合してもよい。本明細書で使用されるとき、B i S A bと「結合している」（たとえば、いくつかの実施形態ではF c領域内で、他の実施形態ではF a b領域内で）B D ２とは、これらの２つの分子が、標的結合のための配向ならびにB i S A b構造のF c部分またはF a b部分との結合を保持するように、それらの間に相互作用を有することを意味する。こうした相互作用の例として、アミノ酸リンカーを介した共有結合、C H ２、C H ３、もしくはC H ２およびC H ３の境界面、またはC H ４領域におけるF a b領域、ヒンジ領域、もしくはF c領域内のB D ２の組換え発現による共有結合、ならびにこうした同じ領域内でのファンデルワールス力および水素結合相互作用などの非共有結合相互作用が挙げられる。本開示の範囲に含まれる結合ドメイン（または「B D」もしくは「結合ユニット」）の非限定的例として、抗体可変領域、抗体フラグメント、s c F v、一本鎖ダイアボディ、または当該技術分野で公知の他の結合ドメインが挙げられる。結合ドメインは、二重特異性一本鎖ダイアボディ、または２つの異なるエピトープを結合するように設計された一本鎖ダイアボディも含む。一態様では、本開示の多重特異性エピトープ結合ドメインの構築に有用なエピトープ結合ドメインは、あらゆる目的において参照により本明細書に援用する米国特許出願公開第２０１００２９８５４１号明細書および同第２０１３００７９２８０号明細書に例示される。

30

40

【００８４】

ある態様では、B i S A bは、s c F vを含む結合ドメインを含むことができる。従って、ある態様では、結合ユニット２はs c F vを含む。s c F vは、フレキシブルなポリペプチドリンカーを介して可変軽鎖ドメイン（V L）に結合した可変重鎖ドメイン（V H）を含むポリペプチド鎖を包含することが理解されよう。図１Ｄ～１Ｆは、B D（ここでは結合ユニット２と表示）が、V L ２およびV H ２で示され得る本明細書に記載のドメインを有するs c F vである、例示的B i S A bの概略図を示す。いくつかの態様では、V H ２とV L ２との間のポリペプチドリンカーはプロテアーゼ切断部位を含む。s c F vのV HドメインおよびV Lドメインは同じ抗体に由来してもまたは異なる抗体に由来しても

50

よい。いくつかの態様では、s c F vのVHまたはVLは目的の標的に結合する1つまたは複数のCDRを含んでもよく、VHドメインまたはVLドメインの残りは、異なる抗体に由来するまたは合成ドメインである。いくつかの態様では、s c F vは、抗体、たとえば目的の標的に結合する当該技術分野において公知の抗体の少なくとも1つのCDRを含む。いくつかの態様では、s c F vは、ある抗体の少なくとも2つのCDRを含む。いくつかの態様では、s c F vは、ある抗体の少なくとも3つのCDRを含む。いくつかの態様では、s c F vは、ある抗体の少なくとも4つのCDRを含む。いくつかの態様では、s c F vは、ある抗体の少なくとも5つのCDRを含む。いくつかの態様では、s c F vは、ある抗体の少なくとも6つのCDRを含む。

【0085】

ある態様では、BDは、受容体のリガンド結合ドメインまたはリガンドの受容体結合ドメインを含んでもよい。いくつかの態様では、BDは、上記に記載の通り、CTLA-4、PD-1、PD-L1、OX40、およびTIM3からなる群から選択される標的上の1つまたは複数のエピトープに対する結合親和性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、結合ドメインは、CTLA-4、PD-1、PD-L1、OX40、およびTIM3からなる群から選択される標的に対する特異的結合活性を呈示する。本明細書に開示するBiSAbは、本明細書に開示する分子標的に対する結合親和性または特異的結合活性を有する結合ドメインのあらゆる組み合わせを含んでもよい。たとえば、本明細書に開示するBiSAbは、CTLA-4およびPD-1；CTLA-4およびPD-L1；CTLA-4およびTIM3；PD-1およびPD-L1；PD-L1およびOX40；PD-1およびTIM3；PD-L1およびTIM3；ならびにTIM3を含む標的に対する二重特異性結合を可能にする結合ドメインの組み合わせを含んでもよい。特定の標的組み合わせに結合する結合ドメインを含むBiSAbは、実施例に例示するが、PD-1/CTLA-4；PD-L1/CTLA-4；PD-1/OX40；PD-L1/OX40；およびPD-1/TIM3の非限定的な組み合わせを含む。

【0086】

いくつかのさらなる実施形態では、BiSAbは、標的分子の少なくとも一方に対して、BiSAbを生成するのに用いられる親単一特異性結合配列の結合活性よりも大きい結合活性（たとえば、結合親和性および/または結合特異性）を呈示する。類似の実施形態では、BiSAbは、標的分子の両方に対して、BiSAbを生成するのに用いられる親単一特異性結合配列の両方の結合活性よりも大きい結合活性（たとえば、結合親和性および/または結合特異性）を呈示し得る。また別の実施形態では、BiSAbは、標的分子の両方に対して、BiSAbを生成するのに用いられる親単一特異性結合配列の組み合わせの結合活性よりも大きい結合活性（たとえば、結合親和性および/または結合特異性）を呈示し得る。単独または組み合わせのいずれでも、親単一特異性結合配列に対するBiSAbの結合特性の増強は、同じ分子をターゲティングする単一特異性治療薬の使用と比較して、たとえ組み合わせで使用した場合でも予想外の利点をもたらす。

【0087】

いくつかの実施形態では、本開示は、CTLA-4、PD-1、PD-L1、OX40、およびTIM3からなる群から選択される標的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントに関する。こうした実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、重鎖配列および軽鎖配列、または重鎖および軽鎖配列のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む重鎖配列および軽鎖配列の1部分を含んでもよい。他の実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、重鎖可変（HCv）領域配列および軽鎖可変（LCv）領域配列、または重鎖および軽鎖配列のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含むHCvおよびLCvの1部分を含んでもよい。また別の実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、重鎖および軽鎖配列のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含んでもよい。いくつかの実施形態では、抗体は、キメラ、ヒト化、またはヒト抗体であってもよい。いくつかの実施形態では、抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体であってもよい。別の実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体である。

【0088】

いくつかの実施形態では、前述のような「親」抗体の全部または抗原結合領域を含むドメインを用いて、本明細書に開示する二重特異性結合タンパク質 (BiSAb) を生成することができる。実施例に例示する非限定的な実施形態は、分子標的の組み合わせに対する二重特異性結合を呈示する BiSAb を生成するために、どのように抗体配列を同定し、組み合わせることができるかに関する説明を提供する。

【0089】

いくつかの方法を単独または組み合わせて用いて、scFv 分子を含む BiSAb の安定性を高めてもよい。単独または本明細書に記載の1つもしくは複数の他の方法と組み合わせて使用できると考えられる1つの方法は、scFv 部分を安定化させるように scFv ドメインを連結するリンカーの長さおよび／または組成を操作することによる。

10

【0090】

使用できると考えられる別の方法は、ジスルフィド結合の形成を促進するように scFv の VH ドメインおよび／または VL ドメインに少なくとも2つのアミノ酸置換 (修飾または突然変異ともいう) を導入することである (たとえば、Brinkmann et al., 1993, PNAS, 90:7538-42; Zhu et al., 1997, Prot. Sci. 6:781-8; Reiter et al., 1994, Biochem. 33:5451-9; Reiter et al., 1996, Nature 14:1239-45; Luo et al., 1995, J. Biochem. 118:825-31; Young et al., 1995, FEBS Lett. 377:135-9; Glockshuber et al., 1990, Biochem. 29:1362-7を参照されたい)。この方法は、単独でもまたは本明細書に記載の他の方法の1つもしくは複数と組み合わせて使用してもよい。

20

【0091】

ある態様では、scFv の VH ドメインおよび VL ドメインに1つまたは複数の突然変異を導入して、scFv を含む BiSAb の発現時に VH ドメインと VL ドメインとの間の鎖間ジスルフィド結合の形成を促進することができる。別の態様では、鎖の同じドメインに2つの突然変異を導入する。ある態様では、異なる鎖に2つの突然変異を導入する。ある態様では、複数の相補的な突然変異を導入して、複数のジスルフィド結合の形成または他の安定化相互作用を促進する。ある態様では、システインを導入してジスルフィド結合の形成を促進する。システインに変異させてもよい例示的アミノ酸として、VH2 のアミノ酸43、44、45、46、47、103、104、105および106、ならびに VL2 のアミノ酸42、43、44、45、46、98、99、100および101が挙げられる。前述の番号付けは、scFv の VH2 および VL2 のみに対する (BiSAb の全長配列または本明細書に提供する配列番号のアミノ酸の位置に対するものではない) 位置を特定する Kabat の番号付けに基づく。システイン残基に変異させてもよいアミノ酸位置の例示的組み合わせとして、VH44-VL100、VH105-VL43、VH105-VL42、VH44-VL101、VH106-VL43、VH104-VL43、VH44-VL99、VH45-VL98、VH46-VL98、VH103-VL43、VH103-VL44およびVH103-VL45が挙げられる。いくつかの態様では、VH のアミノ酸44および VL のアミノ酸100をシステインに変異させる。

30

40

【0092】

単独または本明細書に記載の1つもしくは複数の他の方法と組み合わせて使用してもよい別の方法は、scFv の順序を選択することである。ある態様では、VL ドメインに対する VH ドメインの配向を安定性のために最適化する。ある態様では、scFv は、VH-リンカー-VL の配向である。ある態様では、scFv は、VL-リンカー-VH の配向である。本明細書に開示する新規な BiSAb フォーマットに関する実施形態において、scFv 内のドメインの配向は、scFv が BiSAb の Fc 部分とどのように結合するかを決定することができる。これは、ポリペプチドリンカーに関連して以下により詳細に記載する。ただし、簡単に説明すると、BD (たとえば、scFv) が、任意選択的な

50

ポリペプチドリinker（L1）および（L2）によりCH2、CH3、またはCH2およびCH3の境界面と相互に連結されることから、ドメインの順序は、scFvのいずれの部分がL1と相互に連結され、scFvのいずれの部分がL2と相互に連結されるかを決定する。

【0093】

単独または他の方法と組み合わせて使用してもよいさらなる方法は、scFvの1つまたは複数の表面残基を変異させて1つまたは複数の安定化突然変異を導入することである。いくつかの態様では、scFvのVHドメインおよび／またはVLドメインの一方または両方の1、2、3、4、5、6または6を超える残基を変異させる。ある態様では、scFvのVHドメインのみの変更を行う。ある態様では、scFvのVLドメインのみの変更を行う。ある態様では、scFvのVHドメインおよびVLドメインの両方の変更を行う。各ドメインに同じ数の変更を行っても、または各ドメインに異なる数の変更を行ってもよい。ある態様では、1つまたは複数の変更は、未修飾の親scFvに存在する残基の保存的アミノ酸置換である。他の態様では、1つまたは複数の変更は、未修飾の親scFvに存在する残基の非保存的アミノ酸置換である。scFvのVHドメインまたはVLドメインの一方または両方に複数の置換を行う場合、置換は、それぞれ独立に保存的置換または非保存的置換である。ある態様では、置換は、全て保存的置換である。ある態様では、置換は、全て非保存的である。ある態様では、置換の少なくとも1つは保存的である。ある態様では、少なくとも1つまたは置換は非保存的である。

10

【0094】

それ自体でまたは他の方法と組み合わせて使用してもよいさらに別の方法は、scFvのVHドメインおよび／またはVLドメインの1つまたは複数の残基を変異させて1つまたは複数のアミノ酸置換を導入して、既知の抗体のVHドメインおよび／またはVLドメインのコンセンサス配列の前記特定位置で最も頻度の高い残基にマッチさせることである。ある態様では、scFvのVHドメインおよび／またはVLドメインの一方または両方に1、2、3、4、5、6または6を超える位置で置換を導入する。各ドメインに同じ数の変更を行ってもよく、または各ドメインに異なる数の変更を行ってもよい。ある態様では、あるコンセンサス配列にマッチさせる配列の1つまたは複数の変更は、未修飾のVH配列および／またはVL配列に存在する残基の保存的アミノ酸置換である。他の態様では、1つまたは複数の変更は、未修飾のVH配列および／またはVL配列に存在する残基の非保存的アミノ酸置換である。scFvのVHドメインまたはVLドメインの一方または両方に複数の置換を行う場合、置換は、それぞれ独立に保存的置換または非保存的置換である。ある態様では、置換は、全て保存的置換である。ある態様では、置換は、全て非保存的置換である。ある態様では、置換の少なくとも1つは保存的である。ある態様では、少なくとも1つまたは置換は非保存的である。

20

30

【0095】

scFv部分の修飾または安定化に有用であると記載された修飾のいずれも、Fab部分の修飾に適用できることに留意されたい。たとえば、BiSAbのFab部分の可変ドメインを修飾して、安定性、抗原結合および同種のものを向上させることができる。さらに、Fab部分またはscFv部分を修飾して免疫原性を低下させることもできる。

40

【0096】

ある態様では、結合ユニット2（BD）は、scFv、たとえばグリシン-セリンリンカーなどのフレキシブルリンカーにより相互に連結された可変軽鎖（VL2）および可変重鎖（VH2）を含む通常のモノクローナル抗体に由来するscFvである。任意選択的に、scFvの可変軽鎖および可変重鎖は、1つもしくは複数のジスルフィド結合を介してさらに相互に連結されていてもよく、上記のように、1つもしくは複数の突然変異または変更を含んでいてもよい。scFvは、第2のエピトープに結合する。ある態様では、第2のエピトープは、結合ユニット1が結合する第1のエピトープと異なる。他の態様では、第2のエピトープは、結合ユニット1が結合する第1のエピトープと同じである。ある態様では、scFvは、通常のマウス抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体など通常のモノ

50

クローナル抗体の配列に由来するまたは基づく。ある態様では、通常のモノクローナル抗体の配列に由来するまたは基づく s c F v を含む B i S A b は、通常の抗体の 1 つまたは複数の機能活性を保持する（たとえば、機能活性の少なくとも 80 % 以上（80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、98 %、99 % または 100 %）を保持する）。たとえば、ある態様では、こうした s c F v を含む B i S A b は、通常の抗体の抗原に対する親和性、阻害活性または細胞殺傷活性の 1 つまたは複数を持する。

【0097】

ある態様では、B i S A b は、結合ユニット 1 および結合ユニット 2 の任意の組み合わせを含め、本明細書に記載の結合ユニット 1 および結合ユニット 2 のいずれかを含む。たとえば、ある態様では、本開示は、特定の標的に結合する（たとえば、特定の標的上のエピトープに結合する）F a b、たとえば特定の amino 酸配列を含むまたは特定のヌクレオチド配列によりコードされた F a b、および／または特定の標的に結合する（たとえば、特定の標的上のエピトープに結合する）s c F v、たとえば特定の amino 酸配列を含むまたは特定のヌクレオチド配列によりコードされた s c F v を含むポリペプチドを提供する。

10

【0098】

上に詳述したように、結合ユニット 1 および結合ユニット 2 は、リンカーポリペプチド 1 (L 1、L 2) を介した共有結合により B i S A b と結合させてもよい。一般に、この結合は、相互の連結が重鎖 C_H 2 ドメイン、重鎖 C_H 3 ドメインを介するものか、または重鎖 C_H 2 ドメインおよび C_H 3 ドメインの境界面におけるものか、またはいくつかの実施形態ではヒンジ領域もしくは F a b ドメイン内におけるものであるように B i S A b のキメラ重鎖を介する。L 1 および L 2 は、互いに独立に長さおよび配列が異なってもよく、例示的な構造を本明細書に記載する。本開示は、所望の標的に結合する特異的結合ユニットと本明細書に記載の特定の L 1 および L 2 ポリペプチドリンカーとの任意の組み合わせなど結合ユニットとリンカーポリペプチドとの任意の組み合わせを含む B i S A b を意図している。

20

【0099】

2. F c 領域

本明細書で使用する場合、「F c 領域」は定常領域のフラグメント、アナログ、変異体、ミュータントまたは誘導体を含む、免疫グロブリン、好ましくはヒト免疫グロブリンの定常領域に由来するドメインを包含する。好適な免疫グロブリンとして、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4 および他のクラス、たとえば I g A、I g D、I g E および I g M が挙げられる。F c 領域は、天然配列の F c 領域でも、または改変した F c 領域でもよい。免疫グロブリンの F c 領域は一般に 2 つの定常ドメイン、C_H 2 ドメインおよび C_H 3 ドメインを含み、任意選択的に C_H 4 ドメインを含む。本開示の B i S A b は、L 1 もしくは L 2 の一方または両方のヒンジ部分と同じクラスの F c ドメインを含む。

30

【0100】

a. 改変 F c 領域

本開示の B i S A b のエフェクター機能および／または半減期を変化させるため、改変 F c 領域（本明細書では「変異 F c 領域」ともいう）を使用してもよい。F c 領域では、分子の機能特性および／または薬物動態特性を変化させるため、1 つまたは複数の改変を行ってもよい。こうした改変の結果、I g G の C 1 q 結合および補体依存性細胞傷害 (C D C)、または F c γ R 結合および抗体依存性細胞傷害 (A D C C)、または抗体依存性貪食作用 (A D C P) が低下または増強される。本開示は、機能を増強または減弱するかまたは所望のエフェクター機能を与えることによりエフェクター機能を微調整するための変更を行った B i S A b を包含する。従って、本開示の一態様では、B i S A b は変異 F c 領域（すなわち、下記で考察される改変を行った F c 領域）を含む。本明細書では変異 F c 領域を含む B i S A b を「F c 変異 B i S A b」ともいう。本明細書で使用する場合、「天然の」とは未修飾の親配列を指し、本明細書では天然の F c 領域を含む B i S A b を「天然の F c B i S A b」という。F c 変異 B i S A b は、当業者によく知られてい

40

50

る多くの方法により作製することができる。非限定的な例として、抗体コード領域の単離（たとえば、ハイブリドーマから）およびFc領域における1つまたは複数の所望の置換の実施が挙げられる。あるいは、BiSAbの抗原結合部分（たとえば、可変領域）を、変異Fc領域をコードするベクターにサブクロニングしてもよい。一態様では、変異Fc領域は、天然のFc領域と比較してエフェクター機能を誘導するレベルが同等である。別の態様では、変異Fc領域は、天然のFcと比較してエフェクター機能の誘導が高くなる。別の態様では、変異Fc領域は、天然のFcと比較してエフェクター機能の誘導が低くなる。変異Fc領域のいくつかの具体的な態様を以下に詳述する。エフェクター機能を測定する方法は、当該技術分野において周知である。

【0101】

一般に、エフェクター機能は、以下に限定されるものではないが、アミノ酸置換、アミノ酸付加、アミノ酸欠失、およびFcアミノ酸の翻訳後修飾（たとえば、グリコシル化）における変更などFc領域の変更により修飾する。下記に記載される方法を用いて、本開示のBiSAbのエフェクター機能、FcRに対するFc領域の結合性の割合（たとえば、親和性および特異性）を微調整して、所望の特性を有するBiSAbを得てもよい。

【0102】

本明細書で使用するFc領域は、第1の定常領域の免疫グロブリンドメインを除く、抗体分子の定常領域を含むポリペプチドを含むことが理解されよう。このためFcとは、IgA、IgDおよびIgGの最後の2つの定常領域の免疫グロブリンドメインと、IgEおよびIgMの最後の3つの定常領域の免疫グロブリンドメインと、任意選択的に、これらのドメインのフレキシブルなヒンジのN末端の全部または一部とを指す。IgAおよびIgMの場合、FcはJ鎖を含んでいてもよい。IgGの場合、Fcは免疫グロブリンドメインCガンマ2およびCガンマ3（C γ 2およびC γ 3）、および任意選択的にCガンマ1（C γ 1）とCガンマ2（C γ 2）との間の下方ヒンジ部分を含む。Fc領域の境界は異なってもよいが、本明細書で使用する場合、ヒトIgG重鎖のFc領域は残基A231からそのカルボキシル末端までを含み、番号付けはKababに記載されたEUインデックスに従う。Fcとは、単離されたこの領域を指しても、または抗体、抗体フラグメントもしくはFc融合タンパク質に関連してこの領域を指してもよい。多くの異なるFc位置、以下に限定されるものではないが、EUインデックスにより番号付けされたIgG1の270位、272位、312位、315位、356位および358位で多型が観察されており、従って本配列と従来技術の配列との間に若干の相違が存在してもよい。

【0103】

一態様では、本開示は、天然のFc BiSAbと比較してFcリガンド（たとえば、Fc受容体、C1q）に対する結合性が改変されたFc変異BiSAbを包含する。結合性の例として、結合特異性、平衡解離定数（ K_d ）、解離速度および結合速度（それぞれ k_{off} および k_{on} ）、結合親和性ならびに／またはアビディティーがあるが、これに限定されるものではない。平衡解離定数（ K_d ）が k_{off}/k_{on} と定義されることは、当該技術分野において公知である。ある態様では、低 K_d を有するFc変異領域を含むBiSAbが、高 K_d を有するBiSAbより望ましいことがある。しかしながら、場合により k_{on} または k_{off} の値の方が K_d の値より重要であることもある。当業者であれば、個々の用途にいずれの速度論的パラメーターが最も重要であるかを判定することができる。たとえば、1つまたは複数のポジティブレギュレーター（たとえば、Fc γ RIIIA）に対する結合を低下させる、および／または抑制性Fc受容体（たとえば、Fc γ RIIB）に対する結合を増強する修飾は、ADCC活性を低下させるのに好適であると考えられる。従って、様々な受容体に対する結合親和性の比率（たとえば、平衡解離定数（ K_d ）の比率）から、本開示のFc変異BiSAbのADCC活性が増強または低下されるかどうかを示され得る。加えて、C1qに対する結合を低下させる修飾も、CDC活性を低下または除去するに好適であると考えられる。

【0104】

一態様では、1つまたは複数のFc受容体、以下に限定されるものではないが、FcR

10

20

30

40

50

n、Fc γ RI (CD64) (アイソフォームFc γ RI A、Fc γ RI BおよびFc γ RI Cを含む)；Fc γ RII (CD32、たとえばアイソフォームFc γ RII A、Fc γ RII BおよびFc γ RII C)；およびFc γ RIII (CD16、たとえばアイソフォームFc γ RIII AおよびFc γ RIII B)に対する結合親和性が、Fc変異BiSAbは天然のFc BiSAbと比較して改変される。

【0105】

ある態様では、Fc変異BiSAbはFcリガンドに対する親和性を高めてある。他の態様では、Fc変異BiSAbは、天然のFc BiSAbと比較してFcリガンドに対する親和性を低下させてある。

【0106】

特定の態様では、Fc変異BiSAbはFc受容体Fc γ RIII Aに対する結合を増強させてある。別の特定の態様では、Fc変異BiSAbはFc受容体Fc γ RII Bに対する結合を増強させてある。さらなる特定の態様では、Fc変異BiSAbはFc受容体Fc γ RIII AとFc γ RII Bとの両方に対する結合を増強させてある。ある態様では、Fc γ RIII Aに対する結合を増強させたFc変異BiSAbは、天然のFc BiSAbと比較してFc γ RII B受容体に対する結合を同時に高めていない。特定の態様では、Fc変異BiSAbはFc受容体Fc γ RIII Aに対する結合を低下させてある。さらなる特定の態様では、Fc変異BiSAbはFc受容体Fc γ RII Bに対する結合を低下させてある。別の特定の態様では、Fc変異BiSAbはFc受容体FcRnに対する結合を増強させてある。なお別の特定の態様では、Fc γ RIII Aおよび／またはFc γ RII Bに対する親和性が改変されたFc変異BiSAbは、Fc受容体FcRnに対する結合を増強させてある。なお別の特定の態様では、Fc γ RIII Aおよび／またはFc γ RII Bに対する親和性が改変されたFc変異BiSAbは、天然のFc BiSAbと比較してClqに対する結合を改変してある。

【0107】

別の態様では、Fc変異BiSAbは、天然のFc BiSAbと比較してClqに対する親和性を増加または低下させる。なお別の特定の態様では、Clqに対する親和性が改変されたFc変異BiSAbは、Fc受容体FcRnに対する結合を増強させてある。なお別の特定の態様では、Clqに対する親和性が改変されたFc変異BiSAbは、天然のFc BiSAbと比較してFc γ RIII Aおよび／またはFc γ RII Bに対する結合を改変させてある。

【0108】

抗体が当該技術分野において抗体エフェクター機能と総称される複数のプロセスにより標的抗原の攻撃および破壊を誘導することができることは認識されている。これらのプロセスの1つは、「抗体依存性細胞性細胞傷害」または「ADCC」と呼ばれ、分泌型Igが特定の細胞傷害性細胞（たとえば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球およびマクロファージ）上に存在するFc γ 受容体（Fc γ R）に結合すると、これらの細胞傷害性エフェクター細胞が抗原を有する標的細胞に特異的に結合し、その後、細胞毒で標的細胞を殺傷することができるようになる細胞毒性の形態を指す。標的細胞の表面に対して特異的な高親和性IgG抗体は細胞傷害性細胞を「武装」させるものであり、こうした殺傷に必須である。標的細胞の溶解は細胞外で行われ、細胞間の直接的な接触を必要とするが、補体を必要としない。エフェクター機能という用語により包含されるもう1つのプロセスは、補体依存性細胞傷害（以下「CDC」という）であり、これは、抗体を介して補体系により標的細胞を破壊する生化学的現象を指す。補体系は、抗体と組み合わさって病原菌および他の外来細胞を破壊する、通常の見られる複雑なタンパク質の系である。エフェクター機能という用語に包含されるさらに別のプロセスは抗体依存性貪食作用（ADCP）であり、これは、1つまたは複数のエフェクターリガンドを発現する非特異的な細胞傷害性細胞が、標的細胞上に結合した抗体を認識し、その後、標的細胞の貪食作用を引き起こす細胞性反応を指す。

【0109】

Fc変異BiSAbは、1つまたは複数のFcγRを介したエフェクター細胞の機能に関するインビトロ機能アッセイにより特徴付けられることを意図している。ある態様では、Fc変異BiSAbは、インビボモデルにおいてインビトロ系アッセイと同様の結合性およびエフェクター細胞機能（本明細書に記載および開示されたものなど）を有する。しかしながら、本開示は、インビトロ系アッセイで所望の表現型を示さないが、インビボでは所望の表現型を示すFc変異BiSAbを除外するものではない。

【0110】

Fc領域を含むタンパク質の血清中半減期は、FcRnに対するFc領域の結合親和性を高めることにより延長することができる。「抗体半減期」という用語は、本明細書で使用する場合、投与後の抗体分子の平均生存時間の指標である抗体の薬物動態特性を意味する。抗体半減期は、既知量の免疫グロブリンの50パーセントを患者の体内（または他の哺乳動物）またはその特定のコンパートメントから除去するのに要する時間を、たとえば血清中で見て（すなわち、血中半減期）または他の組織で見て表すことができる。半減期は、免疫グロブリンまたは免疫グロブリンのクラスによって異なってもよい。一般に、抗体（またはBiSAb）半減期を延長すると、投与されたBiSAbの循環血中の平均滞留時間(MRT)が長くなる。

【0111】

半減期を延長すると、患者に投与される薬剤量が減少するほか、投与頻度も低下し得る。BiSAbの血清半減期を延長するには、たとえば米国特許第5,739,277号明細書に記載されているようなサルベージ受容体結合エピトープをBiSAb（特に抗体フラグメント）に組み込んでよい。本明細書で使用する場合、「サルベージ受容体結合エピトープ」という用語は、IgG分子のインビボでの血清中半減期に関わる、IgG分子（たとえば、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4）のFc領域のエピトープを指す。あるいは、半減期の延長された本開示のBiSAbは、FcとFcRn受容体との間の相互作用に関与することが確認されたアミノ酸残基を修飾することにより作製してもよい（たとえば、米国特許第6,821,505号明細書および同第7,083,784号明細書を参照されたい）。さらに、本開示のBiSAbの半減期は、当該技術分野において広く利用される技術によりPEGまたはアルブミンへのコンジュゲーションによって延長してもよい。

【0112】

本明細書に記載のようなFc領域中への別の結合ドメインの挿入および／または抗原による後の結合のいずれもFc活性に影響を及ぼし得ることが考慮される。たとえば、結合抗原は、FcγR、C1q、およびFcRnに対する結合親和性および活性を増大または低減し得る。これは、様々な抗体依存的プロセスをモジュレートするための抗原依存的スイッチを形成し得る。一態様では、抗原結合は、FcRnとの相互作用を低減して、自由BiSAbがFcRnと相互作用して、正常な半減期を有するようにし得るが、BiSAb-Ag複合体の迅速なクリアランス／細胞内在化を可能にする。さらに、これにより、BD2-抗原媒介性相互作用が、BD1と結合した抗原のクリアランスに影響を与えるようにすることができる。別の態様では、BiSAbは、BD2に直接挿入されたFc領域（Fc-BD2）を含むことができる。

【0113】

一態様では、本開示は、Fc領域がKababに記載されたEUインデックスにより番号付けされた221、225、228、234、235、236、237、238、239、240、241、243、244、245、247、250、251、252、254、255、256、257、262、263、264、265、266、267、268、269、279、280、284、292、296、297、298、299、305、308、313、316、318、320、322、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、339、341、343、370、373、378、392、416、419、421、428、433、434、435、436、440および443からなる群から選択される1つまたは複数の位置に修飾

10

20

30

40

50

(たとえば、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失)を含む、Fc変異体を提供する。任意選択的に、Fc領域は、当業者に公知の追加および／または代わりの位置に修飾を含んでよい(たとえば、米国特許第5,624,821号明細書;同第6,277,375号明細書;同第6,737,056号明細書;同第7,083,784号明細書;同第7,317,091号明細書;同第7,217,797号明細書;同第7,276,585号明細書;同第7,355,008号明細書を参照されたい)。さらに、有用なアミノ酸位置および具体的な置換については、米国特許第6,737,056号明細書の表2および6~10;米国特許出願公開第2006/024298号明細書の図41に示される表;米国特許出願公開第2006/235208号明細書の図5、12および15に示される表;米国特許出願公開第2006/0173170号明細書の図8、9および10に示される表および国際公開第09/058492号パンフレットの図8~10、13および14に示される表に例示されている。

【0114】

特定の態様では、本開示は、Fc領域がKabatに記載されたEUインデックスにより番号付けされた221K、221Y、225E、225K、225W、228P、234D、234E、234N、234Q、234T、234H、234Y、234I、234V、234F、235A、235D、235R、235W、235P、235S、235N、235Q、235T、235H、235Y、235I、235V、235E、235F、236E、237L、237M、237P、239D、239E、239N、239Q、239F、239T、239H、239Y、240I、240A、240T、240M、241W、241L、241Y、241E、241R、243W、243L、243Y、243R、243Q、244H、245A、247L、247V、247G、250E、250Q、251F、252L、252Y、254S、254T、255L、256E、256F、256M、257C、257M、257N、262I、262A、262T、262E、263I、263A、263T、263M、264L、264I、264W、264T、264R、264F、264M、264Y、264E、265A、265G、265N、265Q、265Y、265F、265V、265I、265L、265H、265T、266I、266A、266T、266M、267Q、267L、268E、269H、269Y、269F、269R、270E、280A、284M、292P、292L、296E、296Q、296D、296N、296S、296T、296L、296I、296H、296G、297S、297D、297E、298A、298H、298I、298T、298F、299I、299L、299A、299S、299V、299H、299F、299E、305I、308F、313F、316D、318A、318S、320A、320S、322A、322S、325Q、325L、325I、325D、325E、325A、325T、325V、325H、326A、326D、326E、326G、326M、326V、327G、327W、327N、327L、328S、328M、328D、328E、328N、328Q、328F、328I、328V、328T、328H、328A、329F、329H、329Q、330K、330G、330T、330C、330L、330Y、330V、330I、330F、330R、330H、331G、331A、331L、331M、331F、331W、331K、331Q、331E、331S、331V、331I、331C、331Y、331H、331R、331N、331D、331T、332D、332S、332W、332F、332E、332N、332Q、332T、332H、332Y、332A、333A、333D、333G、333Q、333S、333V、334A、334E、334H、334L、334M、334Q、334V、334Y、339T、370E、370N、378D、392T、396L、416G、419H、421K、428L、428F、433K、433L、434A、424F、434W、434Y、436H、440Yおよび443Wからなる群から選択される少なくとも1つの置換を含む、Fc変異体を提供する。任意選択的に、Fc領域は、当業者に公知の追加および／または代わりのアミノ酸置換、以下に限定されるものではないが、その全てが参照により本明細

10

20

30

40

50

書に援用される米国特許第 6, 737, 056 号明細書の表 2 および 6 ~ 10 ; 米国特許出願公開第 2006/024298 号明細書の図 41 に示される表 ; 米国特許出願公開第 2006/235208 号明細書の図 5、12 および 15 に示される表 ; 米国特許出願公開第 2006/0173170 号明細書の図 8、9 および 10 に示される表および米国特許出願公開第 20090041770 号明細書の図 8、9 および 10 に示される表に例示されているものを含んでもよい。

【0115】

特定の態様では、本開示は、Fc 領域が Kabat に記載された EU インデックスにより番号付けされた 228、234、235 および 331 からなる群から選択される 1 つまたは複数の位置に少なくとも 1 つの修飾（たとえば、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失）を含む、Fc 変異 BiSAb を提供する。一態様では、修飾は、Kabat に記載された EU インデックスにより番号付けされた 228P、234F、235E、235F、235Y および 331S からなる群から選択される少なくとも 1 つの置換である。

10

【0116】

別の特定の態様では、本開示は、Fc 領域が IgG4 の Fc 領域であり、Kabat に記載された EU インデックスにより番号付けされた 228 および 235 からなる群から選択される 1 つまたは複数の位置に少なくとも 1 つの修飾を含む、Fc 変異 BiSAb を提供する。なお別の特定の態様では、Fc 領域は IgG4 の Fc 領域であり、非天然のアミノ酸は、Kabat に記載された EU インデックスにより番号付けされた 228P、235E および 235Y からなる群から選択される。

20

【0117】

別の特定の態様では、本開示は、Fc 領域が Kabat に記載された EU インデックスにより番号付けされた 239、330 および 332 からなる群から選択される 1 つまたは複数の位置に少なくとも 1 つの非天然のアミノ酸を含む、Fc 変異 BiSAb を提供する。一態様では、修飾は、Kabat に記載された EU インデックスにより番号付けされた 239D、330L、330Y および 332E からなる群から選択された少なくとも 1 つの置換である。本明細書にその全体を援用する米国特許第 7, 317, 091 号明細書を参照されたい。

【0118】

特定の態様では、本開示は、Fc 領域が Kabat に記載された EU インデックスにより番号付けされた 252、254 および 256 からなる群から選択される 1 つまたは複数の位置に少なくとも 1 つの非天然のアミノ酸を含む、Fc 変異 BiSAb を提供する。一態様では、修飾は、Kabat に記載された EU インデックスにより番号付けされた 252Y、254T および 256E からなる群から選択される少なくとも 1 つの置換である。その全体を本明細書に援用する米国特許第 7, 083, 784 号明細書を参照されたい。

30

【0119】

ある態様では、本開示は、Fc 領域が Kabat に記載された EU インデックスにより番号付けされた 428 位に非天然のアミノ酸を含む、Fc 変異 BiSAb を提供する。一態様では、428 位の修飾は、Kabat に記載された EU インデックスにより番号付けされた 428T、428L、428F および 428S からなる群から選択される。その全体を本明細書に援用する米国特許第 7, 670, 600 号明細書を参照されたい。別の態様では、Fc 変異 BiSAb は、Kabat に記載された EU インデックスにより番号付けされた 434 位に非天然のアミノ酸をさらに含んでもよい。一態様では、434 の修飾は、Kabat に記載された EU インデックスにより番号付けされた 434A、434S および 434F からなる群から選択される。他の態様では、本開示は、Fc 領域が Kabat に記載された EU インデックスにより番号付けされた 428 位および 434 位に非天然のアミノ酸を含む、Fc 変異 BiSAb を提供する。特定の態様では、Fc 領域は 428L、434S を含む。米国特許第 8, 088, 376 号明細書を参照されたい。

40

【0120】

ある態様では、IgG 抗体により誘発されるエフェクター機能は、タンパク質の Fc 領

50

域に結合した糖部分に強く依存する (Claudia Ferrara et al., 2006, Biotechnology and Bioengineering 93: 851-861)。従って、Fc領域にグリコシル化修飾を行ってエフェクター機能を増強または低下させることができる (たとえば、Umana et al., 1999, Nat. Biotechnol 17: 176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74: 288-294; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277: 26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278: 3466-3473; 米国特許第6,602,684号明細書; 同第6,946,292号明細書; 同第7,064,191号明細書; 同第7,214,775号明細書; 同第7,393,683号明細書; 同第7,425,446号明細書; 同第7,504,256号明細書; POTE LL I G E N T (商標) 技術 (Biowa, Inc. Princeton, N. J.); GLYCOMAB (商標) グリコシル化工学技術 (GLYCART biotechnology AG, Zurich, Switzerland) を参照されたい)。従って、一態様では、本開示のBiSAbのFc領域はアミノ酸残基の変化したグリコシル化を含む。別の態様では、アミノ酸残基のグリコシル化を変化させた結果、エフェクター機能が低下する。別の態様では、アミノ酸残基のグリコシル化を変化させた結果、エフェクター機能が増強される。特定の態様では、Fc領域はフコシル化を抑制する。別の態様では、Fc領域を低フコース化する (たとえば、米国特許出願公開第2005/0226867号明細書を参照されたい)。一態様では、エフェクター機能、特にADCCを増強したこうしたBiSAbを、親細胞により産生されるポリペプチドと比較して100倍を超えるADCCを有する、高度にフコースを除去したポリペプチドを産生するように操作された宿主細胞 (たとえば、CHO細胞、コウキクサ (Lemna minor)) に発現させる (Mori et al., 2004, Biotechnol Bioeng 88: 901-908; Cox et al., 2006, Nat Biotechnol., 24: 1591-7)。

【0121】

IgG分子上のオリゴ糖にシアル酸を付加すると、その抗炎症活性を増強し、その細胞毒性を変化させることができる (Keneke et al., Science, 2006, 313: 670-673; Scallion et al., Mol. Immunol. 2007 Mar; 44(7): 1524-34)。上記の研究から、シアリル化を増加させたIgG分子は抗炎症性を有する一方、シアリル化を低下させたIgG分子は免疫賦活性を増強する (たとえば、ADCC活性を増強する) ことが立証される。従って、BiSAbは、特定の用途に適切なシアリル化プロファイルで修飾してもよい (米国特許出願公開第2009/0004179号明細書および国際公開第2007/005786号パンフレット)。

【0122】

一態様では、本開示のBiSAbのFc領域は、天然のFc領域と比較して改変されたシアリル化プロファイルを含む。一態様では、本開示のBiSAbのFc領域は、天然のFc領域と比較して増加したシアリル化プロファイルを含む。別の態様では、本開示のBiSAbのFc領域は、天然のFc領域と比較して減少したシアリル化プロファイルを含む。

【0123】

一態様では、本開示のFc変異体は、他の既知のFc変異体、たとえばGhetie et al., 1997, Nat Biotech. 15: 637-40; Duncan et al., 1988, Nature 332: 563-564; Lund et al., 1991, J. Immunol 147: 2657-2662; Lund et al., 1992, Mol Immunol 29: 53-59; Alegre et al., 1994, Transplantation 57: 1537-1543; Hutchins et al., 1995, Proc Natl. Acad Sci U S

A 92:11980-11984; Jefferys et al, 1995, Immunol Lett. 44:111-117; Lund et al., 1995, FASEB J 9:115-119; Jefferys et al, 1996, Immunol Lett 54:101-104; Lund et al, 1996, J Immunol 157:4963-4969; Armour et al., 1999, Eur J Immunol 29:2613-2624; Idusogie et al, 2000, J Immunol 164:4178-4184; Reddy et al, 2000, J Immunol 164:1925-1933; Xu et al., 2000, Cell Immunol 200:16-26; Idusogie et al, 2001, J Immunol 166:2571-2575; Shields et al., 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Jefferys et al, 2002, Immunol Lett 82:57-65; Presta et al., 2002, Biochem Soc Trans 30:487-490); 米国特許第5, 624, 821号明細書; 同第5, 885, 573号明細書; 同第5, 677, 425号明細書; 同第6, 165, 745号明細書; 同第6, 277, 375号明細書; 同第5, 869, 046号明細書; 同第6, 121, 022号明細書; 同第5, 624, 821号明細書; 同第5, 648, 260号明細書; 同第6, 528, 624号明細書; 同第6, 194, 551号明細書; 同第6, 737, 056号明細書; 同第7, 122, 637号明細書; 同第7, 183, 387号明細書; 同第7, 332, 581号明細書; 同第7, 335, 742号明細書; 同第7, 371, 826号明細書; 同第6, 821, 505号明細書; 同第6, 180, 377号明細書; 同第7, 317, 091号明細書; 同第7, 355, 008号明細書に開示されたものと組み合わせてもよい。Fcドメインの他の修飾および/または置換および/または付加および/または欠失も当業者に容易に明らかになるであろう。

【0124】

天然のFcを含むBiSAbフォーマットに示されたポリペプチドは、例に示すように、FcRnおよびClqに結合してADCCを媒介する能力を保持している点に留意されたい。このためある態様では、BiSAbは、FcRnおよび/またはClqおよび/または1つまたは複数のFcγ受容体(FcγR)に結合する能力を保持している。たとえば、ある態様では、BiSAbはBiSAbが結合するエピトープの1つに結合する通常の抗体と比較して、FcRnおよび/またはClqおよび/または1つまたは複数のFcγRに結合する能力を少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%保持する。ある態様では、BiSAbは1つまたは2つの通常の抗体の結合ドメインから作製され、これらの通常の抗体の一方または両方と活性の比較が行われる。

【0125】

また、改変されたFc領域を使用して重鎖ヘテロ2量体を作製し、2つの異なる重鎖-軽鎖対を含むBiSAbを得てもよい。ヘテロ2量体を形成しやすくするには、一对のFc領域間の境界面を操作して、組換え細胞培養から回収されるヘテロ2量体の割合を最大にする。ある態様では、境界面はCH3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1の抗体分子の境界面の1つまたは複数の小さいアミノ酸側鎖を、より大きい側鎖(たとえば、チロシンまたはトリプトファン)で置換することにより「突起」が生じる。大きいアミノ酸側鎖をより小さいアミノ酸側鎖(たとえば、アラニンまたはトレオニン)で置換することにより、大きい側鎖と同一または類似の大きさの「空洞」が代償として第2の抗体分子の境界面に形成される。これが、ヘテロ2量体の収率をホモ2量体など他の望ましくない最終産物より高めるメカニズムとなる。CH3の修飾としては、たとえば、一方の重鎖のY407V/T366S/L368Aおよび他方の重鎖のT366W; 一方の重鎖のS354C/T366Wおよび他方の重鎖のY349C/Y407V/T366S/L368Aが挙げられる。一方の鎖に突起を、そして他方の鎖に空洞を与える別の修飾については、米国特許第7, 183, 076号明細書; 米国特許出願公開第2014/0

348839号明細書；およびMerchant et al., 1998, Nat. Biotech 16:677-681に記載されている。突起-空洞構成を生じ得る修飾のいくつかの非限定的な例を表1aに示す。ヘテロ2量体を形成するのに使用することができる他の修飾には、静電的に一致するFc領域が共発現するとヘテロ2量化が起こるように、Fc2量体の境界面両端の電荷極性を変化させる修飾があるが、これに限定されるものではない。電荷極性を変化させる修飾には、下記表1bに示したものがあるが、これに限定されるものではない（さらに国際公開第20090182127号パンフレット；Gunasekaran et al., 2010, JBC 285:19637-46も参照されたい）。さらに、Davis et al. (2010, Prot. Eng. Design & Selection 23:195-202)は、ヒトIgGドメインおよびIgA CH3ドメインの誘導体である鎖交換操作ドメイン（SEED: strand-exchanged engineered domain）CH3領域を用いたヘテロ2量体のFcプラットフォームについて記載している（さらに、国際公開第2007/110205号パンフレットも参照されたい）。

【0126】

【表1】

表 1a. ヘテロ2量体化のための CH3 修飾(突起-空洞)

一方の重鎖の修飾	他方の重鎖の修飾
T366Y	Y407T
T366W	Y407A
T366Y	Y407T
T394W	F405A
T366Y/F405A	T394W/Y407T
T366W/F405W	T394S/Y407A
F405W	T394S
D399C	K392C
T366W	T366S/L368A/Y407V
T366W/D399C	T366S/L368A/K392C/Y407V
T366W/K392C	T366S/D399C/L368A/Y407V
S354C/T366W	Y349C/T366S//L368A/Y407V
Y349C/T366W	S354C/T366S//L368A/Y407V
E356C/T366W	Y349C/T366S//L368A/Y407V
Y349C/T366W	E356C/T366S//L368A/Y407V
E357C/T366W	Y349C/T366S//L368A/Y407V
Y349C/T366W	E357C/T366S//L368A/Y407V

【0127】

【表 2】

表 1b. ヘテロ 2 量体化のための CH3 修飾

一方の重鎖の修飾	他方の重鎖の修飾
K370E/D399K/K439D	D356K/E357K/K409D
K409D	D399K
K409E	D399K
K409E	D399R
K409D	D399R
D339K	E356K
D399K/E356K	K409D/K392D
D399K/E356K	K409D/K439D
D399K/E357K	K409D/K370D
D399K/E356K/E357K	K409D/K392D/K370D
D399K/E357K	K409D/K392D
K392D/K409D	D399K
K409D/K360D	D399K

10

【0128】

当業者は、いくつかの態様では、Fc 融合タンパク質が、Fc 領域を含む分子のホモ 2 量体性のために 2 量体を形成し得ることを理解されよう。いくつかの態様では、結合タンパク質（たとえば、BiSAb）の Fc 領域に対して、ヘテロ 2 量体化を促進および／または維持するための突然変異（たとえば、キメラ突然変異、相補的突然変異、ドック・アンド・ロック突然変異、ノブ・イントゥ・ホール突然変異、鎖交換操作ドメイン（SEED）突然変異などを用いた異なる操作を実施してもよく、たとえば、米国特許第 7, 183, 076 号明細書；Merchant et al. (1998) Nat. Biotech 16: 677-681；Ridgway et al. (1996) Protein Engineering 9: 617-621；Davis et al. (2010) Prot. Eng. Design & Selection 23: 195-202；国際公開第 2007/110205 号パンフレット；国際公開第 2007/147901 号パンフレット；Gunasekaran et al. (2010) JBC 285: 19637-46 を参照されたい。これらの全ては、参照により本明細書に援用される）。従って、結合タンパク質を操作して、たとえば、第 1 の結合タンパク質、結合ドメイン、または第 1 の Fc 領域もしくはそのフラグメントと融合した BiSAb、および第 2 の（すなわち、異なる）結合タンパク質、結合ドメイン、または第 2 の Fc 領域もしくはそのフラグメントと融合した BiSAb を含むヘテロ 2 量体を形成することができ、ここで、第 1 および第 2 の Fc 領域、またはそのフラグメントは、ヘテロ 2 量体化するように操作されている。

20

30

【0129】

3. グリコシル化

40

グリコシル化によりポリペプチドのエフェクター機能を変化させられるだけでなく、可変領域のグリコシル化修飾により、標的抗原に対する抗体（または BiSAb）の親和性も変化させることができる。一態様では、本 BiSAb の可変領域のグリコシル化パターンを修飾する。たとえば、非グリコシル化 BiSAb を作製してもよい（すなわち、BiSAb はグリコシル化を欠損している）。グリコシル化は、たとえば、標的抗原に対する BiSAb の親和性を高めるように改変することができる。こうした糖鎖修飾は、たとえば、BiSAb 配列内の 1 つまたは複数のグリコシル化部位を変化させることにより達成することができる。たとえば、1 つまたは複数の可変領域フレームワークのグリコシル化部位を除去し、それによりその部位のグリコシル化を除去する 1 つまたは複数のアミノ酸置換を行ってもよい。こうした非グリコシル化は、抗原に対する BiSAb の親和性を高

50

めることができる。こうしたアプローチについては、米国特許第5,714,350号明細書および同第6,350,861号明細書にさらに詳細に記載されている。また、Fc領域に存在するグリコシル化部位（たとえば、IgGのアスパラギン297）を除去する1つまたは複数のアミノ酸置換を行ってもよい。さらに、非グリコシル化BiSAbは、必要なグリコシル化機構を欠損する細菌細胞を用いて作製してもよい。

【0130】

4. ポリペプチドリンカー

リンカーは、BiSAbキメラ重鎖のドメイン／領域を近接する分子に連結するのに使用することができる。本明細書に記載のように、BiSAbは、1つ、2つ、またはそれを超えるリンカーポリペプチド（たとえば、L1およびL2）を含むことができる。加えて、BiSAbは、別のリンカー、たとえばscFvの可変重鎖および軽鎖を相互に連結するフレキシブルリンカーを含んでもよい。さらに、BiSAbは、別のリンカー、たとえばscFvの可変重鎖および軽鎖を相互に連結するフレキシブルリンカーと、他の結合ユニットをBiSAbコア構造に連結する他のリンカーとを含んでもよい。

10

【0131】

リンカーの例示的かつ非限定的な例として、少なくとも4つの残基を含むポリペプチド鎖がある。こうしたリンカーの一部は、フレキシブルであり、親水性であり、さらにそれ自体の二次構造（リンカー部分またはフレキシブルリンカー部分）をほとんどまたはまったく有さなくてもよい。少なくとも4つのアミノ酸のリンカーは、分子が集合した後、近傍に位置するドメインおよび／または領域を相互に連結するのに使用してもよい。また、より長いまたはより短いリンカーを使用してもよい。このため、リンカーは約1残基、2残基、3残基、4残基、5残基、6残基、7残基、8残基、9残基、10残基、11残基、12残基、13残基、14残基、15残基、16残基、17残基、18残基、19残基、20残基、25残基、30残基、35残基、40残基、45残基、または約50残基の長さでもよい。分子の一部を相互に連結するため複数のリンカーを使用する場合、リンカーは同一でもまたは異なってもよい（たとえば、長さおよび／またはアミノ酸配列が同一または異なる）。

20

【0132】

リンカーは、切断試薬により選択的に切断される少なくとも1つの結合を含む切断可能なリンカーであってもよい。切断可能なリンカーを使用して、リンカー配列の全部または一部を除去しやすくしてもよい。リンカーは、リンカーの内部またはリンカーの少なくとも1つの末端で切断が起こるように、プロテアーゼ切断部位を含むように操作してもよい。たとえば、リンカーの両側の2つの末端各々にトロンピン部位を操作してもよい。また、使用するリンカーの種類に応じて、TCEP、TFAおよびDTTなど薬により切断を媒介してもよい。リンカーは、切断試薬が切断産物からリンカー由来の残基を全て除去するように設計してもよい。他の例示的かつ非限定的なリンカーとして、インビボ条件下で、たとえば、内在性酵素もしくは他の内在性因子の存在下で、または単に体内に存在する水性液体体内もしくは体内の細胞内で結合が選択的に切断され得るプロドラッグリンカーが挙げられる。BiSAbが2つ以上のポリペプチドリンカーを含む場合、リンカーは、それぞれ異なってもよく、またはリンカーの少なくとも1つが他と異なってもよい。いくつかの態様では、BiSAbは切断可能なリンカーを含む。特定の態様では、BiSAbは、VH2とVL2との間に切断可能なリンカーを含むscFvを含む。

30

40

【0133】

リンカーは所望の構造の形成を容易にする。リンカーは(Gly-Ser)_n残基を含み、溶解性を高めるため、Glu残基またはLys残基がある程度全体に分散していてもよい。その代わりにまたはそれに加えて、リンカーはセリン残基をまったく含んでおらず、こうしたリンカーは、リンカーがO-結合型グリコシ化を受ける場合に好ましいことがある。いくつかの態様では、たとえば、リンカーの2量体化を使用してBiSAbのドメインをドメインが適切に折りたたまれた構造にする場合、リンカーは、システイン残基を含んでもよい。いくつかの態様では、BiSAbは、ポリペプチドのドメインを連結する

50

少なくとも2つのポリペプチドリンカーを含む。他の態様では、B i S A bは少なくとも3つのポリペプチドリンカーを含む。他の態様では、B i S A bは4つ以上のポリペプチドリンカーを含む。

【0134】

いくつかの態様では、ポリペプチドリンカーはF c部分の一部を含む。たとえば、いくつかの態様では、ポリペプチドリンカーはI g G 1抗体、I g G 2抗体、I g G 3抗体および／またはI g G 4抗体の免疫グロブリンヒンジドメインの一部を含んでもよい。いくつかの態様では、ポリペプチドリンカーはI g G 1、I g G 2、I g G 3および／またはI g G 4の突然変異免疫グロブリンヒンジドメインの一部を含む。いくつかの態様では、ポリペプチドリンカーは、I g G 1抗体、I g G 2抗体、I g G 3抗体および／またはI g G 4抗体の免疫グロブリンヒンジ領域／ドメインの少なくとも5アミノ酸残基、7アミノ酸残基、8アミノ酸残基または15アミノ酸残基を含む。いくつかの態様では、ポリペプチドリンカーは、I g G 1抗体、I g G 2抗体、I g G 3抗体および／またはI g G 4抗体の修飾免疫グロブリンヒンジ領域／ドメインの少なくとも5アミノ酸残基、7アミノ酸残基、8アミノ酸残基または15アミノ酸残基を含む。

10

【0135】

ポリペプチドリンカーは、3つのシステインを天然に含むヒンジ領域の全部または一部を含んでもよい。ある態様では、完全なおよび／または天然のヒンジ領域に対してシステイン残基の1つまたは2つのみが残るように、選択されたヒンジ領域を切断するか、または他の方法で改変もしくは置換する。同様に、ある種の他の態様では、ポリペプチドリンカーは、システイン残基の数がアミノ酸の置換または欠失により減少しているヒンジ領域の突然変異部分または他の方法で改変された部分を含んでもよく、たとえば突然変異ヒンジ領域または他の方法で改変されたヒンジ領域は、本明細書に記載するように0、1つまたは2つのシステイン残基を含む。

20

【0136】

従って、突然変異ヒンジドメインまたは他の方法で改変されたヒンジドメインは、1つまたは複数のシステイン残基を含む野生型免疫グロブリンヒンジドメインに由来しても、または（それを用いて）構築してもよい。ある態様では、ヒンジ領域の突然変異部分または他の方法で改変された部分はシステイン残基を含まなくても、またはシステイン残基を1つのみ含んでもよく、突然変異ヒンジ領域または他の方法で改変されたヒンジ領域は、それぞれ1つ以上のシステイン残基または2つ以上のシステイン残基を含む、野生型免疫グロブリンヒンジ領域であるか、またはそれに由来している。ヒンジ領域の突然変異部分または他の方法で改変された部分では、野生型免疫グロブリンヒンジ領域のシステイン残基は、好ましくは欠失している、またはジスルフィド結合を形成できないアミノ酸で置換されている。いくつかの態様では、ヒンジ領域の突然変異部分または他の方法で改変された部分は、4つのヒトI g GアイソタイプサブクラスI g G 1、I g G 2、I g G 3またはI g G 4のいずれを含んでもよいヒトI g G野生型ヒンジ領域であるか、またはそれに由来している。

30

【0137】

いくつかの態様では、ポリペプチドリンカーは、免疫グロブリン軽鎖とジスルフィド結合を形成するシステイン残基（E U残基220）を含むヒンジ領域の一部を含む。いくつかの態様では、ポリペプチドリンカーは、E U残基C 220にアミノ酸置換を含むヒンジ領域の改変された部分を含む。いくつかの態様では、ポリペプチドリンカーは、アミノ酸置換C 220 Vを含む。

40

【0138】

いくつかの態様では、ポリペプチドリンカーは、ヒンジ関連の自発的自己切断を防止するアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、ポリペプチドリンカーは、E U位置D 221の位置にアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、ポリペプチドリンカーはアミノ酸置換D 221 Gを含む。いくつかの態様では、ポリペプチドリンカーはアミノ酸D 221を欠損している。

50

【0139】

前述したように、いくつかの実施形態は、gly-serリンカーを含むか、またはgly-serリンカーからなる1つまたは複数のポリペプチドリリンカーを含む。本明細書で使用する場合、「gly-serリンカー」という用語は、グリシン残基およびセリン残基からなるペプチドを指す。例示的gly-serリンカーは、式 $(Gly_4Ser)_n$ のアミノ酸配列を含み、式中、 n は、正の整数（たとえば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10）である。gly-serリンカーのいくつかの好ましい非限定的な例として、 $(Gly_4Ser)_2$ （配列番号41）および $(Gly_4Ser)_4$ 、（配列番号42）、ならびに $(Gly_4Ser)_3$ （配列番号43）が挙げられる。なお他の態様では、ポリペプチドリリンカーに2つ以上のgly-serリンカーを直列に組み込む。いくつかの態様では、ポリペプチドリリンカーは、ヒンジ領域（たとえば、IgG1分子、IgG2分子、IgG3分子またはIgG4分子に由来する）の少なくとも1部分、および一連のgly-serアミノ酸残基（たとえば、 $(Gly_4Ser)_n$ （式中、 n は、2、3、または4である）などのgly-serリンカー）を含む。

10

【0140】

ある態様では、リンカー（たとえば、L1および／またはL2および／またはL3など）は、ヒンジ部分およびリンカー部分、たとえばgly-serリンカーを含むリンカー部分の両方を含む。他の態様では、L1および／またはL2は、ヒンジ部分のみ、またはリンカー部分のみ、たとえばgly-serリンカーのみを含む。他の態様では、L1およびL2は、gly-serリンカー部分を含む。ある態様では、BiSAb内のgly-serリンカーは同じ長さであるのに対し、他の態様では、BiSAb（たとえば、L1およびL2）内のgly-serリンカー部分は異なる長さである。BiSAbがscFvを含む場合、scFvの重鎖および軽鎖は、フレキシブルリンカーによりBiSAb（たとえば、BD1、Fab、Fcなど）に連結されていてもよい。このフレキシブルリンカーは、一般にヒンジ部分を含まず、むしろgly-serリンカーまたは他のフレキシブルリンカーである。scFvのドメインを相互に連結するフレキシブルリンカーの長さおよびアミノ酸配列は、容易に選択しかつ最適化することができる（たとえば、 $(Gly_4Ser)_n$ 、（配列番号48）、式中、 n は、2、3、または4以上である）。

20

【0141】

様々な結合ユニットおよびドメイン（たとえば、結合ドメイン／ユニット（たとえば、Fab-scFv）、または結合ドメイン／ユニットをFc（たとえば、L1およびL2を介してscFv）に相互に連結するのに使用するポリペプチドリリンカーとは無関係に、BiSAbは、任意選択的に、追加のポリペプチドリリンカーを含んでもよい。そうした追加のポリペプチドリリンカーの長さおよび配列は独立に選択される。たとえば、BiSAbは、scFvの可変重鎖および軽鎖を相互に連結するフレキシブルなポリペプチドリリンカーをさらに含んでもよい。このフレキシブルなポリペプチドリリンカーは、gly-serリンカーを含んでもよい。一般に、このリンカーは、ヒンジ部分を含まない。

30

【0142】

ここで、BD2にフランキングするリンカーの長さの変化がBD2抗原結合部位の配向および残りのBiSAb分子に対する間隔に影響を及ぼし得ることが考慮される。たとえば、短いN末端リンカーと長いC末端リンカーとは、結合部位が一方向に配座される配向を生成し得るが、長いN末端リンカーと短いC末端リンカーとは、反対の配座配向に影響を及ぼし得る。従って、リンカーの長さは、BD2抗原結合部位を配向するためにモジュレートすることができ、BD1とBD2との間および／またはBD2と、Fcもしくは他のドメイン内の抗体分子に結合する他の実体との間の立体作用の生成または回避に重要な影響をもたらし得る。

40

【0143】

5. BiSAbの特定の構造

前述したように、本開示の一態様は、2つの重鎖－軽鎖対を含むBiSAb構造配置（プラットフォーム）に関する（図1A～1Fに示す）。この態様のいくつかの実施形態で

50

は、B i S A b キメラ重鎖のポリペプチド配列は、抗体重鎖可変ドメイン（V H 1）を含むポリペプチド配列、抗体重鎖定常ドメイン1（C H 1）を含むポリペプチド配列、F c ドメインの一部、第1のポリペプチドリンカー（L 1）を含むポリペプチド配列、結合ドメイン（B D 2）を含むポリペプチド配列、第2のポリペプチドリンカー（L 2）を含むポリペプチド配列、および残りのF c ドメインを含むポリペプチド配列を含んでもよい。いくつかの態様では、F c ドメインは、C_H 2 ドメインおよびC_H 3 ドメインを含む。このため、ある実施形態は、N末端からC末端に下記の配向：V H 1－C_H 1－C_H 2（N末端）－L 1－B D 2－L 2－C_H 2（C末端）－C_H 3；V H 1－C_H 1－C_H 2－L 1－B D 2－L 2－C_H 3；およびV H 1－C_H 1－C_H 2－C_H 3（N末端）－L 1－B D 2－L 2－C_H 3（C末端）でポリペプチド配列を含んでもよいB i S A b キメラ重鎖を提供する。B i S A b 軽鎖のポリペプチド配列は、軽鎖可変ドメイン（V L 1）および軽鎖定常ドメイン（C L）を含んでもよい。従って、B i S A b 軽鎖は、N末端からC末端に下記の配向：V L 1－C Lでポリペプチド配列を含んでもよい。V H 1、V L 1、およびC Lは、第1のエピトープに結合する「結合ユニット1」（B D 1）の部分を示すために使用される点に留意されたい。B D 2は、第2のエピトープに結合する「結合ユニット2」の部分を示すために使用される。

【0144】

結合ドメインがs c F vである態様では、B i S A b キメラ重鎖は、抗体重鎖可変ドメイン（V H 1）を含むポリペプチド配列、抗体重鎖定常ドメイン1（C H 1）を含むポリペプチド配列、第1のポリペプチドリンカー（L 1）を含むポリペプチド配列、抗体軽鎖可変ドメイン（V L 2）を含むポリペプチド配列、フレキシブルリンカーを含むポリペプチド配列、抗体重鎖可変ドメイン（V H 2）を含むポリペプチド配列、第2のポリペプチドリンカー（L 2）を含むポリペプチド配列、および抗体F c ドメインを含むポリペプチド配列を含んでもよい。このため、B D 2としてs c F vを含むB i S A b のキメラ重鎖は、N末端からC末端に以下の配向：V H 1－C H 1－C H 2（N末端）－L 1－V L 2－L 3－V H 2－L 2－C H 2（C末端）－C H 3；V H 1－C H 1－C H 2－L 1－V L 2－L 3－V H 2－L 2－C H 3；V H 1－C H 1－C H 2－C H 3（N末端）－L 1－V L 2－L 3－V H 2－L 2－C H 3（C末端）；V H 1－C H 1－C H 2（N末端）－L 1－V H 2－L 3－V L 2－L 2－C H 2（C末端）－C H 3；V H 1－C H 1－C H 2－L 1－V H 2－L 3－V L 2－L 2－C H 3；およびV H 1－C H 1－C H 2－C H 3（N末端）－L 1－V H 2－L 3－V L 2－L 2－C H 3（C末端）でポリペプチド配列を含んでもよい。

【0145】

キメラ重鎖は、アミノ酸配列（たとえば、各ポリペプチドドメインのアミノ酸配列）を含むポリペプチド鎖である。キメラ重鎖は、アミノ酸配列（たとえば、各ポリペプチドドメインのアミノ酸配列）を含むポリペプチド鎖である。V H 1、V L 1およびC Lは結合ユニット1の一部を示すのに使用され、V H 1およびV L 1はその第1のエピトープに結合する部分を示す点に留意されたい。V H 2およびV L 2は、第2のエピトープに結合する結合ユニット2の一部を示すのに使用される。ある態様では、追加のs c F v結合ドメインが、B i S A b コアを構成するポリペプチドのN末端および／またはC末端に存在する（ここで、B i S A b は、結合ユニット（B D）3および／または4および／または5をさらに含む）を参照されたい。ある態様では、2つ以上のs c F v結合ドメインがB i S A b コア内に存在する。追加のs c F vは、それぞれV H 3、V H 4、V H 5で示す抗体重鎖可変領域、およびV L 3、V L 4、V L 5で示す対応する抗体軽鎖可変領域を含む。

【0146】

6. 標識、コンジュゲートおよび部分

ある特徴では、薬剤および他の分子は、部位特異的なコンジュゲーションによりB i S A b を標的としてもよい。たとえば、B i S A b は、コンジュゲーション反応のための遊離チオール基が得られるシステイン操作ドメイン（結合ユニットおよび／またはF c ドメ

10

20

30

40

50

インに導入されたシステインを含む)を含んでもよい。ある態様では、特異的なコンジュゲーション部位を含むようにB i S A bを操作してもよい。いくつかの態様では、本開示は、F c領域が、E Uインデックスにより番号付けされた239位、282位、289位、297位、312位、324位、330位、335位、337位、339位、356位、359位、361位、383位、384位、398位、400位、440位、422位および442位の1つまたは複数にアミノ酸置換を含むF c変異B i S A bを提供する。いくつかの態様では、F c領域は、以下の群：a) 289位および440位；b) 330位および440位；c) 339位および440位；d) 359位および440位；e) 289位および359位；f) 330位および359位；g) 339位および359位；h) 289位および339位；i) 330位および339位；j) 289位および330位；k) 339位および442位；l) 289位、339位および442位；m) 289位、330位および339位；n) 330位、339位および442位；ならびにo) 289位、330位および442位の群の1つまたは複数に置換を含む。他の態様では、本開示は、F a bアームのC H 1ドメインが、E Uインデックスにより番号付けされた131位、132位、134位、135位、136位および139位の1つまたは複数に置換を含むB i S A bを提供する。一態様では、置換は、システイン、リジン、チロシン、ヒスチジン、セレノシステインおよびセレノメチオニンから選択されるアミノ酸の置換を含む。特定の態様では、置換はシステインである。安定なシステイン操作抗体を作製するための方法は、その内容全体を本明細書に援用する米国特許第7, 855, 275号明細書、米国特許出願公開第20110033378号明細書および米国特許出願公開第20120213705号明細書に記載されている。

【0147】

7. 例示的な標的

本明細書に記載される様々なD u e t M a bおよびB i S A bプラットフォームに関する態様および実施形態は、いずれかの所望の1つまたは複数の標的と結合するように作製することもできるが、本明細書に開示するB i S A bは、特定の標的分子対を標的とするのが好ましい(たとえば、結合ユニット1は、標的の一方に結合し、結合ユニット2は、他方の標的に結合する)。前述した通りかつ以下の例示的な実施例で例証するように、本明細書に開示する抗体、D u e t M a bおよびB i S A bは、レシピエント対象、または培養中の免疫細胞における免疫応答をモジュレートする分子を標的とする。いくつかの実施形態では、結合ドメインは、C T L A-4、P D-1、P D-L 1、O X 40、およびT I M 3からなる群から選択される標的に対する特異性結合活性を呈示する。D u e t M a bおよびB i S A bは、様々な順序および配向で異なる結合ドメインの組み合わせを含むことができ、これらのドメインは、本明細書に開示する標的に対する結合親和性を有するか、またはそれらと特異的に結合する。たとえば、本明細書に開示するD u e t M a bおよびB i S A bは、C T L A-4およびP D-1；C T L A-4およびP D-L 1；ならびにC T L A-4；C T L A-4およびT I M 3；P D-1およびP D-L 1；P D-L 1およびO X 40；P D-1およびT I M 3；P D-L 1およびT I M 3などの標的に対する二重特異性結合を可能にする結合ドメインの組み合わせを含んでもよい。特定の標的組み合わせに結合する結合ドメインを含むD u e t M a bおよびB i S A bは、実施例に例示され、P D-1/C T L A-4；P D-L 1/C T L A-4；P D-1/T I M 3；およびP D-L 1/O X 40の非限定的な組み合わせを含む。ある実施形態では、B i S A bは、B i S A bを作製するために使用される個別の単一特異性結合タンパク質の組み合わせの結合特性と比較して増強された結合特性を有する。

【0148】

ある態様では、本開示のD u e t M a bまたはB i S A bは同じ標的上の2つの異なるエピトープに結合する(たとえば、結合ユニット1は標的上の第1のエピトープに結合し、結合ユニット2は同じ標的上の第2のエピトープに結合する)。

【0149】

いくつかの態様では、本開示のD u e t M a bまたはB i S A bが多量体であることに

より、標識または療法剤が特定の細胞型または分子の標的を標的とすることができる。たとえば、Duet MabまたはBiSAbの1つの機能ドメインが細胞表面の標的に結合し、同時に同じDuet MabまたはBiSAbの別の機能ドメインが検出に有用なハプテンまたは標識剤に結合することができる。同様に、1つの機能ドメインが細胞標的に結合し、同時に第2の機能ドメインがトキシンに結合することができる。両方の結合反応が単一の分子により媒介されるため、トキシンが細胞傷害機能に影響を及ぼす細胞標的の近傍にトキシンを配置することができる。

【0150】

B. BiSAbをコードする核酸分子

本開示は、BiSAbをコードする核酸分子を提供する。本開示の一態様は、本開示のBiSAbのいずれかをコードする核酸分子を提供する。核酸分子は、本明細書に開示するBiSAb分子のいずれか、ならびに本明細書に開示する個別の結合ドメインのいずれか（たとえば、scFv）の重鎖および／または軽鎖をコードし得る。当業者であれば、当該技術分野において周知であるように、特定の生物についての核酸コドン縮退ならびにコドン頻度を考慮して、そうしたポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列が変動し得ることを認識されよう。

【0151】

C. BiSAbを作製するためのベクターおよび宿主細胞ならびに後の精製

本開示は、BiSAbを作製するための方法に関する。ある態様では、本明細書に開示するBiSAbの全部または一部をコードする組換え核酸分子を発現コンストラクトの1つまたは複数の調節ヌクレオチド配列に作動可能に連結してもよい。BiSAbの軽鎖およびキメラ重鎖をコードする核酸配列は、任意の配向（たとえば、軽鎖が重鎖の前またはその逆）で同じ発現ベクターにクローニングしてもよく、または2つの異なるベクターにクローニングしてもよい。1つのベクターを用いて発現を行う場合、2つのコーディング遺伝子は、それ自体の遺伝子エレメント（たとえば、プロモーター、RBS、リーダー、停止、ポリAなど）を有していてもよく、または1セットの遺伝子エレメントでクローニングしてもよいが、シストロンエレメントに連結する。調節ヌクレオチド配列は一般に、発現に使用される宿主細胞に適切なものとする。種々の宿主細胞に適切な発現ベクターおよび好適な調節配列の多くの種類が当該技術分野において公知である。典型的には、前記1つまたは複数の調節ヌクレオチド配列として、プロモーター配列、リーダー配列またはシグナル配列、リボソーム結合部位、転写開始および終結配列、翻訳開始配列および終結配列、ならびにエンハンサーまたはアクチベーター配列を挙げることができるが、これに限定されるものではない。本開示は、当該技術分野において公知の構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターを意図している。プロモーターは、天然プロモーターでも、または2つ以上のプロモーターのエレメントを組み合わせたハイブリッドプロモーターでもよい。発現コンストラクトは細胞のエピソーム、たとえばプラスミド上に存在してもよく、または発現コンストラクトを染色体に挿入してもよい。

【0152】

ある態様では、発現ベクターは、形質転換された宿主細胞の選択を可能にする選択可能なマーカー遺伝子を含む。選択可能なマーカー遺伝子は当該技術分野において周知であり、使用する宿主細胞によって異なる。ある態様では、本開示は、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、かつ少なくとも1つの調節配列に作動可能に連結された発現ベクターに関する。調節配列は当該技術分野で知られており、コードされたポリペプチドの発現を誘導するように選択される。従って、調節配列という用語は、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御エレメントを含む。例示的かつ非限定的な調節配列については、Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990)に記載される。発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択および／または発現が望まれるタンパク質の種類のような要因によって異なることがあることを理解すべきである。さらに、特定のベクターのコピー数、コピー数を制

御する能力、およびベクターによりコードされた他の任意のタンパク質、たとえば抗生物質マーカーの発現も考慮すべきである。

【0153】

本開示は、本開示のB i S A bを作製する方法にさらに関する。たとえば、B i S A bをコードする1つまたは2つ以上の発現ベクター（たとえば、キメラ重鎖および軽鎖をコードする単一のベクター、またはキメラ重鎖をコードするベクターと軽鎖をコードするベクターとの2つのベクター）をトランスフェクトした宿主細胞を適切な条件下で培養してポリペプチドの発現が起こるようにしてもよい。B i S A bを分泌させ、ポリペプチドを含む細胞と培地との混合物から単離してもよい。あるいは、B i S A bを細胞質または膜画分に保持し、細胞を採取、溶解してタンパク質を単離してもよい。細胞培養物は、宿主細胞、培地および他の副産物を含む。細胞培養に好適な培地は当該技術分野において周知である。タンパク質を精製するには、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、限外濾過、電気泳動およびイムノアフィニティ精製などの当該技術分野において公知の技術を用いてB i S A bを細胞培養基、宿主細胞または両方から単離してもよい。ある態様では、B i S A bは、その精製を容易にするドメインを含む融合タンパク質として作製する。

10

【0154】

クローン化遺伝子またはその一部を、原核細胞、真核細胞（酵母、トリ、昆虫または哺乳動物）または両方の発現に好適なベクターにライゲートして組換え核酸を作製してもよい。組換えポリペプチドを産生する発現媒体には、プラスミドおよび他のベクターがある。たとえば、好適なベクターとして、原核細胞、たとえばE. コリ (E. coli) での発現用の下記の種類のプラスミド：p B R 3 2 2 由来のプラスミド、p E M B L 由来のプラスミド、p E X 由来のプラスミド、p B T a c 由来のプラスミドおよびp U C 由来のプラスミドが挙げられる。ある態様では、哺乳動物発現ベクターは、細菌においてベクターを伝播しやすくする原核生物配列および真核細胞に発現する1つまたは複数の真核生物転写ユニットの両方を含む。p c D N A I / a m p 由来、p c D N A I / n e o 由来、p R c / C M V 由来、p S V 2 g p t 由来、p S V 2 n e o 由来、p S V 2 - d h f r 由来、p T k 2 由来、p R S V n e o 由来、p M S G 由来、p S V T 7 由来、p k o - n e o 由来およびp H y g 由来のベクターは、真核細胞のトランスフェクションに好適な哺乳動物発現ベクターの例である。これらのベクターの一部は、細菌プラスミド、たとえばp B R 3 2 2 由来の配列で修飾して、原核生物細胞および真核細胞の両方において複製および薬剤耐性選択を行いやすくする。あるいは、真核細胞におけるタンパク質の一過性発現には、ウイルス、たとえばウシバビローマウイルス (B P V - 1) またはエプスタインバーウイルス (p H E B o、p R E P 由来およびp 2 0 5) の誘導體を使用してもよい。プラスミドの調製および宿主生物の形質転換に使用される様々な方法は、当該技術分野において知られている。原核細胞および真核細胞の両方に好適な他の発現系のほか、一般的な組換え手順については、M o l e c u l a r C l o n i n g A L a b o r a t o r y M a n u a l, 2 n d E d., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) Chapters 16 and 17を参照されたい。場合により、組換えポリペプチドを、バキュロウイルス発現系の使用により発現させると望ましい場合がある。そうしたバキュロウイルス発現系の例として、p V L 由来のベクター (p V L 1 3 9 2、p V L 1 3 9 3 および p V L 9 4 1 など)、p A c U W 由来のベクター (p A c U W 1 など)、および p B l u e B a c 由来のベクター (β -g a l を含む p B l u e B a c I I I) が挙げられる。

20

30

40

【0155】

分子が産生されたら、タンパク質、免疫グロブリン分子または他の多量体分子を精製するための当該技術分野において公知の任意の方法により、たとえばクロマトグラフィー（たとえば、イオン交換クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー（特に特異的な抗原タンパク質Aまたはタンパク質Gに対する親和性による）、およびサイズカラムクロマ

50

トグラフィー)、遠心分離、溶解度差、またはタンパク質の精製のための他の任意の多量体分子技術を用いて分子を精製してもよい。さらに、本明細書に開示の分子は、精製を促進するために日常的に使用される異種ポリペプチド配列(たとえば、アフィニティタグ)と融合させてもよい。

【0156】

B i S A bをどのように作製および精製するかにかかわらず、B i S A bの機能的結合活性を確認するために、結合アッセイ、たとえば二重E L I S Aアッセイを(精製前および/または後に)行ってもよい。こうした結合アッセイは、一般に、当該技術分野において周知である。

【0157】

10

D. 医薬製剤

ある態様では、本開示は、医薬組成物を提供する。こうした医薬組成物は、B i S A bをコードする核酸分子を含む組成物であってもよい。また、こうした医薬組成物は、D u e t M a b、B i S A b、D u e t M a bの組み合わせ、またはB i S A bの組み合わせと、薬学的に許容される賦形剤とを含む組成物であってもよい。ある態様では、本開示の医薬組成物は、薬物として使用される。

【0158】

E. 使用

本明細書に述べるように、D u e t M a bおよびB i S A bを用いて、癌および細胞増殖性疾患または障害に関連する標的に結合させることができ、これらの疾患または障害は、たとえば、免疫抑制活性を阻害し、および/または標的分子に関連する免疫応答を誘導することにより、免疫療法に应答性となり得る。たとえば、異常シグナル伝達および/または阻害された免疫応答は、望ましくない細胞増殖および癌に寄与し得る。従って、本明細書に開示するD u e t M a b、B i S A bおよび抗体は、癌を標的とする、阻害された、低減したまたは不十分な免疫応答に関連する望ましくない細胞増殖および/または癌を治療するために用いることができる。特に、腫瘍および/または腫瘍の体積の腫瘍成長曲線は、たとえば、癌に罹患したヒト患者などの対象における免疫応答を誘導および/または刺激するB i S A bのD u e t M a bの投与によって低下し得る。

20

【0159】

このように、本開示は、それを必要とする対象への本明細書に開示する結合タンパク質の投与を含む様々な方法にも関する。一態様では、本開示は、癌を有するかまたは発症するリスクがある対象において免疫応答を誘導する方法に関し、これは、本明細書に開示する結合タンパク質を対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、対象において癌に対する免疫応答を活性化する。いくつかの実施形態では、本方法は、対象において癌に対する免疫応答を増強する。いくつかの実施形態では、本方法は、対象において阻害された免疫応答経路を活性化し、この活性化が、対象における癌を標的とする免疫応答を増大する。いくつかの実施形態では、本方法は、対象における癌を標的とする免疫応答経路を増強する。

30

【0160】

別の態様では、本開示は、それを必要とする対象の癌を処置する方法に関し、これは、本明細書に開示する結合タンパク質を対象に投与することを含む。一実施形態では、癌を処置する方法は、対象の癌の成長を停止させるかまたは緩徐にすることを含む。一実施形態では、癌を処置する方法は、対象における癌の他の部位への転移を停止させるかまたは緩徐にすることを含む。一実施形態では、癌を処置する方法は、対象において癌細胞を殺傷することを含む。一実施形態では、癌を処置する方法は、対象において癌細胞の増殖および/または広がりを停止させることを含む。

40

【0161】

前述の態様の様々な実施形態において、本方法は、腫瘍疾患および/または癌疾患のために患者を処置することに関する。複数の実施形態では、癌は、対象において誘導された免疫応答に対して感受性である癌の群から選択される。いくつかの実施形態では、癌は、

50

卵巣癌、乳癌、大腸癌、前立腺癌、子宮頸癌、子宮癌、精巣癌、膀胱癌、頭部および頸部癌、黒色腫、膵臓癌、腎細胞癌、または肺癌の1つまたは複数である。いくつかの実施形態では、癌は、消化管または胃腸癌（たとえば、肛門癌；胆管癌；肝臓外胆管癌；虫垂癌；カルチノイド腫瘍、結腸癌；小児大腸癌を含む大腸癌；小児食道癌を含む食道癌；膀胱癌；小児胃癌を含む胃（胃）癌；成人（原発性）肝細胞癌および小児肝細胞癌を含む肝細胞癌（たとえば、肝細胞癌腫）；小児膵臓癌を含む膵臓癌；肉腫、横紋筋肉腫；膵島細胞癌；直腸癌；および小腸癌）；肺癌（たとえば、小細胞肺癌（NSCLC）および小細胞肺癌（SCLC）；頭部および頸部癌（たとえば、口唇および口腔癌；小児口腔癌を含む口腔癌；下咽頭癌；小児咽頭癌を含む咽頭癌；原発不明転移性扁平上皮性頸部癌；口腔癌；鼻腔および副鼻腔癌；小児鼻咽頭癌を含む鼻咽頭癌；口腔咽頭癌；副甲状腺癌；咽頭癌；小児唾液腺癌を含む唾液腺癌；咽喉癌；および甲状腺癌）；卵巣癌および乳癌から選択される。

10

【0162】

前述の方法において、対象に投与される結合タンパク質の量は、対象において免疫応答を誘導し、免疫応答を増大し、癌の成長を停止させるかもしくは緩徐にし、癌の転移を停止させるかもしくは緩徐にし、癌細胞を殺傷し、かつ／または癌細胞の増殖および／もしくは広がりを停止させるかもしくは緩徐にする上で有効である。

【0163】

前述の方法の実施形態において、結合タンパク質は、本明細書に開示するDuetma bおよびBiSAbを含む。前述の方法のいくつかの実施形態では、結合タンパク質は、

20

【0164】

本明細書で使用されるとき、「対象」という用語は、ヒトおよび非ヒト動物、特に哺乳動物を含むことが意図される。対象の例として、障害、たとえば癌などの本明細書に記載する障害を有するヒト患者、または正常な患者を有するヒト患者が挙げられる。「非ヒト動物」は、全ての脊椎動物、たとえば非哺乳動物（たとえば、ニワトリ、両生類、爬虫類など）ならびに非ヒト霊長類、家畜および／または農業用動物（たとえば、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウシ、ブタなど）および齧歯動物（たとえば、マウス、ラット、ハムスター、モルモットなど）などの哺乳動物を含む。特定の実施形態では、対象は、ヒト患者である。

【0165】

30

「処置」または「処置する」は、治療処置および予防または予防的措置の両方を指す。処置が必要な対象は、すでに障害を有する者および障害を有する傾向がある者または障害を予防すべきである者を含む。処置を必要とする疾患または対象について使用するとき、この用語は、従って、疾患の進行を停止または緩徐にすること、疾患の寛解、症状の予防、疾患および／もしくは症状の重症度の軽減、または未処置の対象と比較して疾患の長さの短縮を含むが、これらに限定されない。複数の実施形態では、治療方法は、治療しようとする特定の疾患の1つまたは複数の臨床的適応を緩和することができる。

【0166】

以下に記載する実施例は、上に記載した本開示の特定の態様および実施形態を示すために付与されるものであり、記載の範囲または添付の特許請求される主題を限定するものとして解釈すべきではない。

40

【実施例】

【0167】

材料および方法

免疫応答モジュレーションアッセイ

本明細書に記載される免疫療法薬分子のいくつかにより誘導された潜在的免疫応答を評価するために、サイトメガロウイルス（CMV）抗原リコールアッセイを使用した。アッセイのための試薬は、以下を含む：

- CMV反応性凍結末梢血単核細胞（PBMC）；
- AIM V（登録商標）Medium（Life Technologies，c

50

at # 12055-091) ;

ー リン酸緩衝食塩水 (PBS, Life Technologies, cat # 20012-043) ;

ー Peptivator (登録商標)、CMVpp65ペプチドプール、(Miltenyi Biotec, cat # 130-093-438, 50 µg/ml) ;

ー オボアルブミン、(Thermo scientific cat # 77120, 1mg/ml) ;

ー Coatar、96ウェルプレート非TC処理 (Corning, cat # 3788) ; および

ー 免疫療法薬分子。

10

【0168】

一般的アッセイプロトコル：

アッセイを実施する前日、凍結PBMCを温かいAIM V培地中で解凍した。Coater丸形ウェルプレート内で細胞を2回洗浄した。細胞の濃度を 1×10^6 細胞/mLに調節した。

【0169】

細胞のアリコート (100 µL) を個々のウェルに分配し、プレートの外側の行列を空のまま残した。細胞を一晩静置した。

【0170】

翌日、 $2 \times$ Peptivator CMVペプチドプール (0.1 µg/ml ~ 0.05 µg/ml 最終) および $2 \times$ 免疫療法薬分子を含有する100 µLのAIMV培地をウェルに添加した。

20

【0171】

72時間後、各ウェルからの25 µLの上清を、予め遮断および洗浄したMSDプレート (抗ヒトIFNγ) に移した。標準溶液を添加した後、プレートを室温で2時間インキュベートした。インキュベーション時間後、MSDプレートを3回洗浄した。洗浄後、25 µLのSULFO-TAG検出抗体を添加し、室温で1時間反応させた。プレートを再度洗浄し、150 µLの $2 \times$ MSD読み取り緩衝液を添加した後、読み取りを行った。

【0172】

ブドウ球菌 (Staphylococcal) エンテロトキシンA/B (SEA/SEB) アッセイプロトコル

30

IL-2免疫応答に対するDuet MabまたはBiSAbの作用を決定するために、SEBまたはSEAアッセイプロトコルのいずれかで使用する試薬は、以下を含む：

ー 白血球錐体 (NHSTコードNC24; Addenbrookes Hospital から) ;

ー 50ml Falconチューブ (BD352070) ;

ー Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare 17-1440-02) ;

ー 抗CD3 (クローンOKT3; 1mg/ml; eBioscience; cat no: 16-0037-85) ;

40

ー 塩化アンモニウム溶液 (Stemcell Technologies 07850) ;

ー -20°C で保存される、1mg/mlのブドウ球菌 (Staphylococcal) エンテロトキシンA (SEA; Sigma, S-9399) またはブドウ球菌 (Staphylococcal) エンテロトキシンB (SEB; Sigma, S-4881) ストック溶液：

ー 培地 (全てLife Technologiesから) : 10% v/v 熱不活性化FCS (90005M) および100 U/mL ペニシリン + 100 µg/ml のストレプトマイシン (15140-122) を補充したglutamax (61870) を含むRPMI 1640 ;

50

- － V字底プレート (Greiner BioOne 651201) ;
- － 96ウェル平底プレート (Corning Costar 7107)。

【0173】

IL-2 DELFIA ELISAのための試薬は、以下を含む：

- － FLUONUNC Maxisorp ELISAプレート (Nunc 437958) ;
- － ユロピウム標識ストレプトアビジン、SA-EU (Perkin-Elmer 1244-360) ;
- － DELFIA (登録商標) アッセイ緩衝液 (Perkin-Elmer, #4002-0010) ;
- － DELFIA (登録商標) 強化溶液 (Perkin-Elmer 4001-0010) ; 使用前はRT ;
- － アッセイ希釈剤：0.1% BSAで補充し、滅菌濾過したDEL F I A洗浄緩衝液 (0.05% Tween (登録商標) - 20、20mM Tris、150mM NaCl ; pH 7.2 ~ 7.4) ;
- － 粉乳 (Marvel ; Premier Foods) ;
- － サンプル希釈剤 (PRMI 1640 + 10% FCS + 1% ペニシリン / ストレプトマイシン (前述と同様)) ;
- － PBS (ThermoFisher 14190235) ;
- － PBS-Tween (登録商標) (PBS中の0.01% Tween (登録商標) - 20) ;
- － ヒトIL-2 ELISAキット (Duo set DY202, R&D Systems) ;
- － 自動プレートローダ付きBiotekプレートウォッシャー (EL406)。

10

20

【0174】

一般的アッセイプロトコル

密度勾配遠心分離 (Ficoll-Paque PLUS ; GE Healthcare) を用いてヒト血液白血球錐体 (NHS Blood and Transplant Service code NC24) からPBMCを単離し、続いて赤血球を塩化アンモニウム溶液 (Stemcell Technologies) 中に溶解させた。抗ヒトCD3 (PBS中0.5ug/mlのクローンOKT3 ; eBioscience) を平底96ウェルプレート (Corning Costar 7107) 内で37℃において2時間コーティングした。次に、培地 (10% v/v 熱不活性化ウシ血清および100 U/100ug/mlのストレプトマイシン / ペニシリン (それぞれ) (Life Technologies) で補充したRPMI 1640-Glutamax) 中のPBMCに1ウェル当たり 0.2×10^6 細胞を添加した。0.0088 ~ 0.1ug/mlの範囲内のブドウ球菌エンテロトキシン (Staphylococcal Enterotoxin) AまたはB (SEB ; Sigma Aldrich) の添加によりPBMCをさらに刺激した後、候補Duet MabまたはBiSAbを最終試験濃度まで添加した。37℃および5% CO₂での3日の培養後、上清を細胞から取り出し、市販のELISAを用いて、製造者の指示 (R&D Systems Duo set product code DY202) に従い、IL-2分泌を決定した。図90を参照されたい。

30

40

【0175】

混合白血球反応 (MLR) アッセイプロトコル (新鮮な血液)

さらに、本明細書に開示するDuet MabおよびBiSAbに応答するT細胞機能のインビトロ相関を得るために、MLR細胞アッセイも使用した。新鮮な血液サンプルからMLRアッセイを実施するのに使用される試薬は、以下を含む：

- － 8mL CPTヘパリンチューブ ;
- － AIM-V Medium (無血清) Gibco #12055-091、添加剤なし ;

50

- ー 50 ml コニカルチューブ；
- ー 2 ml 凍結保存容器；
- ー ACK溶解緩衝液（Gibco #A10492-01）；
- ー 96ウェル組織培養物処理丸底プレートBD Falcon #3077；
- ー 陽性対照としてのPHA（Roche）1 mg/ml（10 µg/mL最終濃度）

。

【0176】

一般的アッセイプロトコル

CTPヘパリンチューブに導入した血液サンプルからPBMCを調製した。25℃において、ブレーキを用いず2700 rpmで20分間チューブを遠心分離した。血清の上層を吸引した。残りの物質をピペットで穏やかに採取し、CPTチューブプラグ上方にある全てを回収し、50 mlのコニカルチューブに導入した。細胞にAIM-V培地を添加して、細胞を洗浄した（ブレーキをオンにして、1500 rpm、25℃で5分を3回）。残った赤血球は、全て赤血球溶解緩衝液（たとえば、約3 mlの緩衝液で約5分）を用いて溶解させた。残った細胞をAIM-V培地（ブレーキをオンにして、1500 rpm、25℃で5分）で2回洗浄した。必要に応じて、ペレットを単一チューブ内で固め、AIM-V培地中に再懸濁させて、細胞カウントを実施した。

10

【0177】

MLRアッセイを実施するために、96ウェルプレートにおいて、1ドナー当たり50 µl（計400,000/100 µl）のAIM-V培地中、200,000細胞/ドナー/ウェルで細胞を平板培養した。候補分子を1ウェル当たり（4×）50 µlで添加し、無血清AIM-V培地で希釈した。72時間後、プレートをイメージングし、30 µlの上清をヒトTH1/TH2（MSD）サイトカインアッセイのために取り出した。

20

【0178】

ヒトTH1/TH2 MSD 10-plexプロトコル

このアッセイを用いて、本明細書に開示するDuet MabおよびBiSAbの投与に応答して培養上清中に存在するサイトカインの量を決定した。このアッセイを実施するために、200 mgの遮断剤Bを1プレート当たり20 mlのPBS中に溶解させることにより、遮断剤を調製した。溶解させた150 µlの遮断剤を各ウェルに添加した。プレートを密封してから、室温で2時間または4℃で一晩振盪した。ウェルをPBST緩衝液で3回洗浄した。凍結した校正物質ブレンド10 µlを1 mlの希釈剤で希釈することにより、校正物質を調製し、これをさらに連続的に4倍希釈した。ウェルを分離するために、25 µlの校正物質（標準）および25 µlのサンプルを添加した。ウェルを振盪しながら、室温で2時間インキュベートした。インキュベーション後、ウェルをPBSTで3回洗浄した。

30

【0179】

検出抗体を調製し、必要濃度まで希釈した後、各ウェルに添加した。振盪しながら室温で2時間のインキュベーション後、ウェルをPBSTで（3回）洗浄した。MSD装置で読み取る前に読み取り緩衝液を各ウェルに添加した。

【0180】

腫瘍特異的殺傷アッセイプロトコル

ヒトgp100₂₀₉₋₂₁₇ペプチドに対する反応性を有するヒトCD8+T細胞株（JR6C12）は、Dr. Steven Rosenberg（米国国立癌研究所（National Cancer Institute），Bethesda, MD）から好意的に提供された。JR6C12細胞を、CFSE（CellTrace CFSE proliferation kit, ThermoFisher）標識ヒト黒色腫細胞株（Mel624）と一緒に1:1比（20,000 JR6C12+20,000 Mel624）で96ウェル平底プレートにおいて37℃で18時間同時培養した。同時培養の0時点で候補分子を69 nMの濃度で添加した。18時間後、明視野顕微鏡によりウェルを視覚化した。MSD分析のために上清を収集し、接着細胞をトリプシン処理してから、

40

50

PBSで(2×)洗浄した後、生体染色(Zombie UV Fixable Viability kit, Biolegend)に付した。CFSE標識細胞の生体染色剤の取り込みをLSRFortessa(BD)でのフローサイトメトリーにより評価した。

【0181】

実施例1. 結合ドメイン結合のための候補Fc位置の決定

オープンソースソフトウェアPyMOL分子視覚化システムを用いて、結合ドメイン結合のための候補領域、たとえば露出表面ループを見出すために、CH2およびCH3領域において、ならびにCH2-CH3境界面またはその付近で抗体構造を調べた。こうした領域は、IgGまたは第2の結合ドメイン自体の構造完全性もしくは安定性を損なうことなく、第2の結合ドメイン(たとえば、scFv)の挿入に適合しているであろう。この分析から3つの領域が見出された(図1A~1Cに球体として表される)。図1D、1E、および1Fは、結合ドメインの実施形態を描き、それぞれ図1A、1B、および1Cで見出されたループの各々における第2の結合ドメイン(例示の目的のためにscFvを有する)の結合を示す。

10

【0182】

図2Aは、CH2-CH3境界面付近のCH2領域において見出され、配列ISRTTP(配列番号39)を含む見出された代表的ループの1つのアミノ酸配列のさらに詳細な概略図を提供する。結合ドメインをこのアミノ酸配列内に挿入して、任意の数の代表的コンストラクト、たとえば実施例に例示するような挿入scFvドメイン(たとえば、I-scFv-SRTTP、IS-scFv-RTP、ISR-scFv-TP、またはISRT-scFv-P、scFv-ISRTTP、およびISRTTP-scFvを作製してもよく、ここで、「-scFv-」は、結合ドメインが結合され得るネイティブループ配列における地点を明らかにする。図2Bは、CH2-CH3境界面で見出され、アミノ酸配列AKGQP(配列番号40)を含むループを表す同様の概略図である。ここに記載される代表的なコンストラクトは、本明細書に記載する通りこのループ配列に付着した結合ドメイン(たとえば、scFvドメイン)を含んでよく、こうしたものとして、A-scFv-KGQP、AK-scFv-GQP、AKG-scFv-QP、AKGQ-scFv-P、scFv-AKGQ、AKGQ-scFvが挙げられ、ここで、「-scFv-」は、結合ドメインが結合され得るネイティブループ配列における地点を明らかにする。図2Cは、CH3領域内のCH2-CH3境界面の下流で見出され、アミノ酸配列SNGを含む代表的なループの概略図を提供する。このループ配列の代表的なコンストラクトは、上の他の2つのループ領域についての例示的な実施形態に関して論じられ、scFv-SNG、S-scFv-NG、SN-scFv-G、およびSNG-scFvを含む。

20

30

【0183】

実施例2. 一連の親抗体ならびに結合ユニットの組み合わせを含む二重特異性結合タンパク質の作製および特性決定

一連のモノクローナル抗体を作製し、特性決定した。これらの「親」抗体に由来する抗原結合配列(たとえば、CDR、HCv、LCv、HC、LC)の組み合わせを用いて一連の二重特異性結合タンパク質を作製したところ、これらは、組み合わせた標的抗原に対して二重特異性結合活性を有することが判明した。二重特異性結合タンパク質は、本明細書に開示する特定の構造プラットフォームモチーフ(すなわち「BIS5」)を有するように設計された。

40

【0184】

親抗体配列を以下の表に記載する。

【0185】

【表 3】

表 2a. 親抗体配列

PD-1

説明/標的	配列
PD-1 LC	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRHMYYWYQQKPGQAPRLLI YLTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC (配列番号23)
PD-1 LCv	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRHMYYWYQQKPGQAPRLLI YLTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGT KLEIK (配列番号49)
PD-1 HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYI SSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAPNSF YEYYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV DHK PSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK (配列番号50)
PD-1 HCv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYI SSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAPNSF YEYYFDYWGQGTTVTVSS (配列番号51)

10

20

30

【0186】

【表 4】

CTLA-4

説明/標的	配列
CTLA-4 HC _v	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPRG ATLYYYYYGMDVWGQGTTVTVSS (配列番号52)
CTLA-4 HC	GVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSNKY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPRGATLYYYYY GMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVH (配列番号53)
CTLA-4 LC _v	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINSYLDWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYSTPFTFGPGTKVEIK (配列番号54)
CTLA-4 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINSYLDWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYSTPFTFGPGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号55)

10

20

【 0 1 8 7 】

【表 5】

PD-L1

説明/標的	配列
PD-L1 (AMP714) HCv	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGYTFP <u>PDYYMNWVRQAPGKGLEWVGDI</u> <u>DPNYGGTTYNASVKGRFTISVDRSKSIAYLQMSSLKTEDTAVYYCARGALTD</u> WGQGTMTVTVSS (配列番号56)
PD-L1 (AMP714) LC	QIQLTQSPSILSASVGDRVTTTCRASSSVSYIYWFQQKPGKAPKPLIYATFN <u>LAS</u> GVPSRFSGSGSGTSYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSNNPLTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号57)
PD-L1 (AMP714) LCv	QIQLTQSPSILSASVGDRVTTTCRASSSVSYIYWFQQKPGKAPKPLIYATFN <u>LAS</u> GVPSRFSGSGSGTSYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSNNPLTFGQGTKVEIK (配列番号58)
PD-L1 (MEDI4736) HCv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWV <u>ANI</u> <u>KQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGW</u> <u>FGELAFDYWGQGT</u> LVTVSS (配列番号59)
PD-L1 (MEDI4736) LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLIYD <u>ASS</u> <u>RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWT</u> FGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC (配列番号33)
PD-L1 (MEDI4736) LCv	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLIYD <u>ASS</u> <u>RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWT</u> FGQGTKVEIK (配列番号60)

10

20

30

【表 6】

TIM3

説明/標的	配列
TIM3 (WT) #62 LC	QTVLTQPPSVSVAPGKTASISCGGDNIGGKSVHWYQQKPGQAPVLVIYYDSD <u>RPSGIPQRFSGSNSGNTATLTIHRVEAGDEADYYCQVLDRRSDHWLFGGGTK</u> LTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPV KAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP TECS (配列番号61)
TIM3 (WT) #62 LCv	QTVLTQPPSVSVAPGKTASISCGGDNIGGKSVHWYQQKPGQAPVLVIYYDSD <u>RPSGIPQRFSGSNSGNTATLTIHRVEAGDEADYYCQVLDRRSDHWLFGGGTK</u> LTVL (配列番号62)
TIM3 (WT) #62 HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS <u>GSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYGT</u> <u>YYGNYFEYWGRGTLTVVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP</u> EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPH KPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK (配列番号63)
TIM3 (WT) #62 HCv	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS <u>GSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYGT</u> <u>YYGNYFEYWGRGTLTVVSS</u> (配列番号64)
TIM3 (生殖系列化) #62 LC	SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGDNIGGKSVHWYQQKPGQAPVLVIYYDSD <u>RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVLDRRSDHWLFGGGTKL</u> TVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP TECS (配列番号65)
TIM3 (生殖系列化) #62 LCv	SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGDNIGGKSVHWYQQKPGQAPVLVIYYDSD <u>RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVLDRRSDHWLFGGGTKL</u> TVL (配列番号66)

10

20

30

40

【表 7】

TIM3 (生殖系列化) #62 HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYGT YYGNYFEYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号67)
TIM3 (生殖系列化) #62 HCv	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYGT YYGNYFEYWGQGTLLTVSS (配列番号68)

10

【0190】

20

【表 8】

OX40

説明/標的	配列
OX40 HCv	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGKLEYIGYISY NGITYHNPSLKSRLTINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGG HAMDYWGQGTLLTVSS (配列番号69)
OX40 LCv	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSK LHSGVPSRFSGSGSDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGSALPWTFGQGTKVEIK (配列番号70)
OX40 HC	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGKLEYIGYISY NGITYHNPSLKSRLTINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGG HAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPK SNTKVDKRVKPKCDKTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号71)
OX40 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSK LHSGVPSRFSGSGSDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGSALPWTFGQGTKVEIK RTVAAPSFIFFPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSSTLSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRG EC (配列番号72)

30

40

【0191】

【表 9】

表 2b. 抗原配列

説明/標的	配列
PD-1 ヒト	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPFTSPALLVVTEGDNAT FTCSFSNTSESVFLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGR DFHMSVVRARRNDSGTLYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPS PSPRPAGQFQTLVVGGVGGLLGLSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPL KEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMTSSP ARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL (配列番号73)
PD-L1 ヒト	MRIFAVFIFMTYWHLLNAPYNKINQRILVVDPTSEHELTCQAEGYPKAEVIW TSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTNEIFYCTFRRLDPEENHT AELVIPELPLAHPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQ DTNSKKQSDTHLEET (配列番号74)
CTLA-4 ヒト	MACLGFQRHKAQLNLATRTWPCTLLFFLLFIPVFCKAMHVAQPAVVLAASSRG IASFVCEYASPGKATEVRVTVLRLQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICT GTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGNGTQIYVIDPEPCP DSDFLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKMLKKRSPLTTGVYVKMPTEPEC EKQFQPYFIPIN (配列番号75)
TIM3 ヒト	MFSLPFDVCVLLLLLLLLLRSSEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAPGNLVPVC WGKGACPVFECGNVLRTERDENVYWTSRYWLNGDFRKGDVSLTIENVTL ADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNKLVIKPAKVTPAPTRQRDFTAAFPRLTTRG HGPAETQTLGSLPDINLTQISTLANELRDSRLANDLRDSGATIRIGIYIGAGICA GLALALIFGALIFKWYSHSKEKIQNLSLISLANLPPSGLANAVAEGIRSEENIYTI EENVYEEVEEPNEYCYVSSRQQPSQPLGCRFAMP (配列番号76)
OX40 ヒト	MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNG MVSRCRSQNTVCRPCGPGFYNDVSSKPCKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQ DTCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHT LQPASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQGPSTRPVE VPGGRAVAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRT PIQEEQADAHSTLAKI (配列番号78)

【0192】

実施例 2 (a) PD-1 / CTLA-4 二重特異性結合タンパク質

特定の理論に拘束されるわけではないが、PD-1 と CTLA-4 遮断の組み合わせには強固な臨床上および前臨床上の理論的根拠がある。従って、PD-1 と CTLA-4 との組み合わせの危険度／受益度比を最大にすることが望ましいであろう（図 4）。

【0193】

表 2 で上に同定された親配列を用いて、PD-1 および CTLA-4 に結合する以下の二重特異性結合タンパク質を作製した。BiS2、BiS3、および BiS5 として識別

10

20

30

40

50

されるタンパク質は、以下に同定される配列を用いて作製し、後述するO c t e t 結合アッセイを用いて同時抗原結合活性について評価した。

【0194】

【表 10】

表 3. PD-1/CTLA-4のためのBiSコンストラクト

説明	配列
Bis2 PD-1/CTLA-4 HC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSINSYLDWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYSTPFTFG CGTKVEIKGGGGSGGGSGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLR LSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWDGSGNKKYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPRGATLYYYYYYGM DVWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAPNSFYEYFDYWQGTITV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKV DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVIV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK (配列番号1)
Bis2 PD-1/CTLA-4 LC	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRHMWYQQKPGQA PRLIYLTNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQWSS NPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (配列番号2)
Bis3 PD-1/CTLA-4 HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKLE WVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARRAPNSFYEYFDYWQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVIVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVME ALHNHYTQKSLSLGLGKGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVIT TCRASQSINSYLDWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCQYYSTPFTFGCGTKVEIKGGGGSGGGSGG GGGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQ APGKCLEWVAVIWDGSGNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDPRGATLYYYYYYGM DVWGQGTITVTVSS (配列番号3)
Bis3 PD-1/CTLA-4 LC	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRHMWYQQKPGQA PRLIYLTNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQWSS NPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (配列番号6)

【表 1 1】

Bis5 PD-1/CTLA-4 HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLE WVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARRAPNSFYEYYFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINSYLDWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYYSTPFTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVES GGGVVQPRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVAIVWY DGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDP RGATLYYYYYGMDVWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGQPENNYKTP PVLDSGSGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL SLGK (配列番号5)
Bis5 PD-1/CTLA-4 LC	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRHYWYQKPGQA PRLIYLTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQWSS NPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (配列番号6)

10

20

【0196】

Octet 結合アッセイ (Bis2、Bis3、および Bis5)

本明細書に開示する二重特異性結合分子の結合を評価するために、Ni-NTA バイオセンサーチップを備える Octet QK および 10×キネティック緩衝液を使用した (ForteBio, Menlo Park, CA)。この特定のシリーズの二重特異性結合タンパク質の場合、His タグ付き PD-L1-Fc、his タグ付き PD-1-Fc および CTLA-4-Fc (ヒト組換えタンパク質) を R&D Systems (Minneapolis, MN) から購入した。全ての結合アッセイは 25℃ で実施した。

30

【0197】

分析前にサンプルプレートを 1000 rpm で攪拌した。Ni-NTA バイオセンサーチップを事前に 1×キネティック緩衝液で 5 分間湿潤させた。1×キネティック緩衝液は、ベースライン決定のためのランニング緩衝液および抗原および二重特異性抗体の希釈緩衝液としての役割も果たした。Ni-NTA バイオセンサーチップを、抗原捕捉のために 100 nM his タグ付き PD-L1-Fc (以下の (b) を参照されたい) または his タグ付き PD-1-Fc 中に約 1 分間浸漬した。抗原をコーティングしたバイオセンサーチップを各々 10 μg/ml の二重特異性抗体中に約 5 分間浸漬した後、100 nM CTLA-4-Fc 抗原を含有するウェルのカラム内に 2 分間移した。結合の結果を図 3 に示す。

40

【0198】

表 2 で上に同定された親配列を用いて、PD-1 および CTLA-4 に結合する Duet Mab フォーマットの二重特異性結合タンパク質を作製した。PD-1/CTLA-4

Duet Mab を以下の表 4 に示す配列を用いて作製し、PD-1/CTLA-4 Bis5 との比較を含め、後述するように評価した。

【0199】

【表 1 2】

表 4. PD-1/CTLA-4のためのDuetMabコンストラクト

説明	配列
DuetMab PD-1(LO115) LC アミノ酸	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCS <i>ASSKHTNLYWSR</i> HMVWYQQKPGQA PRLLIY <i>LT</i> SNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYC <i>QQWSS</i> NPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号7)
DuetMab PD-1(LO115) LC 核酸	CAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACCCTGTCCCTGAGCCCTGG CGAGAGAGCCACCCTGAGCTGCTCCGCCTCCTCCAAGCACACCAAC CTGTACTGGTCCCGGCACATGTACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCC AGGCCCCCTCGGCTGCTGATCTACCTGACCTCTAACCGGGCCACCGG CATCCCTGCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCAGACTTCACCC TGACCATCTCCAGCCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTG CCAGCAGTGGTCTCCAACCCCTTCACCTTCGGCCAGGGCACCAAG CTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCC TGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGT GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACG CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACA GGGAGAGTGT (配列番号8)
DuetMab PD-1(LO115) HC アミノ酸	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <i>GF</i> TFSDYGMHWVRQAPGKGLE WVAY <i>ISSGSYTIYSADSVK</i> GRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY CARRAPNS <i>FYEYFDY</i> WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA SIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号9)

10

20

30

【 0 2 0 0 】

【 0 2 0 1 】

30

【表 1 4】

DuetMab CTLA-4 LC 核酸	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGG AGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAACAGC TATTTAGATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAACTCC TGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCT AGTGGCAGTGGAATCTGGGACAGATTTCACCTCTCACCATCAGCAGTC TGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGTATTACAGT ACTCCATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGAATCAAAGGTC AGCCCAAGGCGGCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTGCTCTGAG GAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACT TCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCC CGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCTCCAAACAAAGCAA CAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAG TGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGG AGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAAGTGTCA (配列番号11)	10
DuetMab CTLA-4 HC アミノ酸	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS <i>SGFTFSSYGMH</i> WVRQAPGKGLE WVA <i>VIWYDGSNKYYADSVK</i> GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARD <i>PRGATLYYYYYGMD</i> VWGQGTTVTVSSASTKGPSVCPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSVDKTHTCPPCP APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号12)	20

【 0 2 0 2 】

【表 15】

DuetMab CTLA-4 HC 核酸	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGA GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAGC TATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGT GGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGA CTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC ACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTG TGTATTACTGTGCGAGAGATCCGAGGGGAGCTACCCTTTACTACTA CTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC TCCTCAGCGTCGACCAAAGGTCCGAGCGTGTGCCCGCTGGCACC GA GCAGCAAAAGCACCTCTGGTGGCACCGCAGCACTGGGTTGTCTGGT GAAAGATTATTTCCGGAACCGGTTACCGTTTCTTGGAATAGCGGTG CACTGACCAGCGGTGTTTCATACCTTTCCGGCAGTCCTGCAGAGCAG CGGTCTGTATAGCCTGTCTAGCGTTGTTACCGTTCCGAGCAGCAGCC TGGGCACCCAGACCTATATTTGCAATGTGAATCATAAACCGAGCAA TACCAAAGTTGATAAACGCGTTGAACCGAAAAGCGTGGACAAAAC CACACGTGCCACCGTGCCAGCACCTGAGTTCGAGGGGGGACCGT CAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCa gCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC ACAGGTCTACACCCTGCCCCCATGCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC CAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACA TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTAT AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA GAAGAGCTTAAGCCTGTCTCCGGGTAAA (配列番号13)
-------------------------------	---

10

20

30

【0203】

Octet 結合アッセイ (DuetMab)

2つの個別の抗原に対する同時結合試験をOctet分析によって実施した。ビオチン化ヒトPD-1をストレプトアビジンセンサーにロードした後、まずDuetMab PD-1/CTLA-4、次に可溶性CTLA-4抗原との連続的相互作用を行った。ストレプトアビジン (SA) バイオセンサー (ForteBio) を用いてPBS pH7.2、3mg/mlのBSA、0.05% (v/v) Tween (登録商標) 20 (アッセイ緩衝液) 中5μg/mLのビオチン化ヒトPD-1を捕捉した。洗浄ステップ後、ロードしたバイオセンサーを、まず133nMのDuetMab PD-1/CTLA-4二重特異性抗体を担持するサンプルウェルと、次に200nMのヒトCTLA-4抗原を担持するウェルとの連続的な会合および解離相互作用に付した。結合の結果を図5に示す。

40

【0204】

PD-1/CTLA-4 DuetMab二重特異性抗体の固有の動態もBiacoreにより評価した。Biacore T200計器 (Biacore) を用いて結合実験を実施した。抗体を捕捉するためにマウス抗huIgG-Fabを2000RUの標的応答までCM5チップに固定化した。約100応答単位の捕捉抗体を達成するために、100nMのDuetMabまたはmAbを20μL/分で5分間流した。次に、50μl/分の流量で5分間抗原を連続的に注射した。動態パラメーター (k_{on} および k_{off}) ならびに解離定数 (KD) を、BIAevaluation 4.1ソフトウェアを用いて

50

非線形フィットから計算した。結合結果を表5に示す。

【0205】

【表16】

表5. PD-1/CTLA-4についてのBiaCoreデータ

	捕捉表面	PD1	CTLA4	k_{on}	k_{off}	K_D	χ^2
				($\times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	($\times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$)	(nM)	
抗-PD-1	mu-抗-huIgG	hu		3.02	2.37	0.79	0.08
(LO115) IgG	mu-抗-huIgG	cyno		3.46	2.38	0.69	0.06
	mu-抗-huIgG	mu		1.49	665	447	0.13
抗-CTLA-4	mu-抗-huIgG		hu	6.33	3.04	0.48	0.27
IgG	mu-抗-huIgG		cyno	11.47	6.74	0.59	0.47
PD-1/CTLA-4 DuetMab	mu-抗-huIgG	hu		2.95	2.36	0.81	0.03
	mu-抗-huIgG	cyno		4.90	2.15	0.44	0.03
	mu-抗-huIgG	mu		1.40	693	496	0.12
	mu-抗-huIgG		hu	6.84	4.21	0.42	0.08
	mu-抗-huIgG		cyno	11.43	6.34	0.55	0.18

【0206】

リポータ遺伝子アッセイ

リポータ遺伝子アッセイからの結果は、PD-1/CTLA-4二重特異性結合タンパク質がPD-1およびCTLA-4経路を阻害したことを示す(図6A~D)。BiS5結合タンパク質は、親と比較してPD-1力価を維持したが、抗CTLA-4 IgGと比較して力価が約3倍低下した。DuetMab抗体は、PD-1力価の約9倍の低下およびCTLA-4について約16倍の低下を示した(IgG4Pと比較して)。当該技術分野において、CTLA-4ターゲティングは低いが、機能的活性(たとえば、SEBアッセイに示す通り)を維持する分子が求められる。このように、PD-1/CTLA-4二重特異性結合タンパク質は、患者に安全性の利益をもたらす可能性を有する。

【0207】

ブドウ球菌エンテロトキシン(Staphylococcal Enterotoxin) B(SEB)アッセイ

SEBアッセイからの結果は、DuetMabとBiS5AbがSEB一次免疫細胞アッセイにおいて同等の活性を有することを明らかにし(図7)、DuetMabは、DummyDuet対照アームと比較して高い活性を示した(図8A)。DuetMabは、親分子の組み合わせとほぼ同等の活性、またLO115またはCTLA-4抗体MEDI1123(トレメリムマブ)と比較して高い活性を示した(図8B)。最後に、BiS5およびDuetMabは、新規のアイソタイプ対照の組み合わせと比較して高い活性を示した(図9A~B)。データは、2つの独立した実験を通して4ドナーから取得し、これらの具体的なアッセイには、IFN γ の使用が必要であった。

【0208】

混合白血球反応(MLR)アッセイ

PD-1/CTLA-4二重特異性分子を試験するためにMLRアッセイを実施した。PD-1/CTLA-4 DuetMabおよびBiS5Abは、混合白血球反応(MLR)アッセイにおいて同等の活性を有した(図10A~C)。PD-1/CTLA-4 DuetMabは、DummyDuet/アイソタイプ対照アームの組み合わせと比較して高い活性を有した(図11A~D)。PD-1/CTLA-4 DuetMabは、親

抗体対照の組み合わせと比較してほぼ同等の活性を有した（図12A～D）。最後に、PD-1/CTLA-4 Duet Mabは、競合PD-1/CTLA-4組み合わせと比較してほぼ同等の活性を有し、抗PD-1単独（たとえば、ペムブロリズマブおよびニボルマブ）よりも高い活性を有した（図13A～D）。

【0209】

薬物動態および薬力学的（PK/PD）試験

カニクイザルにおいて単回用量薬物動態/薬力学（PK/PD）を調べるために試験を実施した。試験設計を図14に示す。Duet Mabは、カニクイザルにおいて明瞭な薬力学（PD）を示し、両方の分子について堅固なPD応答が観察された（図15A～B）。このように、インビボ環境でのPD-1/CTLA-4二重特異性結合タンパク質の生存能を確認する。

10

【0210】

T細胞依存性抗体応答（TDAR）

表示量（0.5、5、50mg/kg）のDuet MabまたはBiS5二重特異性分子をカニクイザルに静脈内（伏在静脈または橈側皮静脈）投与した。スカシガイ（Keyhole limpet）ヘモシアニン（KLH）タンパク質を滅菌条件下において適切な量の滅菌注射液で再構成した。低用量KLH溶液を各動物の背中に2回（1日目および29日目）皮下投与した。さらなる分析のために血液サンプルを全ての動物から採取した。KLH特異的IgMおよびIgG抗体力価の評価を実施した。ELISAを用いて血清中の抗KLH抗体を検出した。

20

【0211】

PD-1/CTLA-4 Duet Mab（図16A）およびPD-1/CTLA-4 BiS5Abを投与したカニクイザルにT細胞依存性抗体応答（TDAR）が認められた（図16B）。

【0212】

様々なレベルのヒトPD-1および/またはCTLA-4を発現するCHO細胞

PD-1/CTLA-4二重特異性分子を試験するために、様々なレベルのヒトPD-1および/またはCTLA-4を発現する安定したCHO細胞を用いてモデル系を作製した（図17）。蛍光標識可溶性PD-1およびCTLA-4タンパク質を用いて、細胞結合Duet Mab上の自由抗原結合アームをフローサイトメトリーにより検出した。このアッセイの結果は、PD-1/CTLA-4 Duet Mabが同じ細胞の表面上のPD-1およびCTLA-4に同時に結合することを明らかにする（図18A～C）。

30

【0213】

CTLA-4は、クラスリン被覆ピット中に絶えず取り込まれ、任意の時点で細胞表面に発現される受容体の小さい画分となるに過ぎない。細胞表面CTLA-4の再利用は迅速であり、表面CTLA-4の80%未満が5分以内に内在化される。従って、過剰PD-1を発現する細胞上でCTLA-4が飽和した状態において、抗PD-1および抗CTLA-4抗体の組み合わせに対して協同的結合がPD-1/CTLA-4 Duet Mabを識別するか否かを調べるために実験を行った（図19A～C）。標的抗PD-1および抗CTLA-4 mAbを用いて各標的抗原の受容体占有を独立に決定した。

40

【0214】

親モノクローナル抗体は、非標的受容体には測定可能な作用を及ぼすことなく、それらの標的受容体に結合してそれを占有することが判明した（図20A～D）。PD-1/CTLA-4 Duet Mabは、モノクローナル抗体の組み合わせと比較して約250倍低い濃度で過剰PD-1を発現するCHO細胞上でCTLA-4を飽和させた（図21A～D）。PD-1/CTLA-4 Duet Mabは、CTLA-4のみを発現する細胞と比較して約500倍低い濃度で過剰PD-1を発現するCHO細胞上でCTLA-4を飽和させた（図22A～F）。予め混合した全CHO集団内でのダブレット形成の定量により決定されるように、PD-1/CTLA-4 Duet Mabは、同じ細胞の表面上のPD-1およびCTLA-4と優先的にシス結合した（図23A～B）。しかし、PD

50

PD-1/CTLA-4 Duet Mabは、単一発現細胞とトランス結合することもできる。PD-1/CTLA-4 Duet Mabは、親抗CTLA-4抗体、トレメリムマブの内在化特性を帯びた（図24A～D）。特定の理論に拘束されるわけではないが、この分子が示す作用は、PD-1のダウンレギュレーションを誘導する可能性がある。PD-1/CTLA-4 Duet Mabの内在化特性は、10倍過剰のPD-1を発現する安定なCHO細胞にも認められた（図25B）。

【0215】

実施例2（b）PD-L1/CTLA-4二重特異性結合タンパク質

表2で上に同定された親配列を用いて、PD-1およびCTLA-4に結合する下記の二重特異性結合タンパク質を作製した。BiS2、BiS3、およびBiS5として識別されるタンパク質は、以下の表6に示す配列を用いて作製し、以下に同定された配列を、セクション2（a）で前述したようにOctet結合アッセイを用いて同時抗原結合活性について評価した（図26）。

10

【0216】

【表 1 7】

表 6. PD-L1/CTLA-4のためのBiSコンストラクト

説明	配列
Bis2 PD-L1/CTLA-4 HC	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQSINSYLDWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSTPFTFG CGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVESGGGVVQPGRLR LSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVAWIWYDGSNKYYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPRGATLYYYYYGM DVWGQGTITVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGTIV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKV DKRVESKYGPPCPPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (配列番号14)
Bis2 PD-L1/CTLA-4 LC	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLI YDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGLPWT FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (配列番号15)
Bis3 PD-L1/CTLA-4 HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKLE WVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCAREGGWFGELAFDYWGQGTIVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPPAPEFLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLKGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSINSYLDWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSTPFTFGCGTKVEIKGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKCLEWVAWIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDPRGATLYYYYYGMDVWGQGTITVTVSS (配列番号16)

10

20

30

40

【 0 2 1 7 】

【表 18】

Bis3 PD-L1/CTLA-4 LC	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLI YDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPLWT FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号17)
Bis5 PD-L1/CTLA-4 HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLE WVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCAREGGWFGELAFDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVEISKYGPCCPAPAEFLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGGGGSGGGGSDIQTSPSSLSASVGDRTTICRASQSINSYLD WYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQQYYSTPFTFGCGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQ LVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKCLEWVA VIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDPRGATLYYYYYGMDVWGQGTITVTVSSGGGSGGGGSGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQ KSLSLSLGK (配列番号18)
Bis5 PD-L1/CTLA-4 LC	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLI YDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPLWT FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号19)

10

20

30

【0218】

実施例 2 (c) PD-1/TIM3 二重特異性結合タンパク質

表 2 で上に同定された親配列を用いて、PD-1 および TIM3 に結合する下記の二重特異性結合タンパク質 (表 7) を作製した。Bis3、Bis5、および Duet Mab として識別されるタンパク質は、以下で同定される配列を用いて作製し、Octet 分析により、同時結合試験について評価した。手短には、PBS pH 7.2、3 mg/ml の BSA、0.05% (v/v) Tween (登録商標) 20 (アッセイ緩衝液) 中 2 μg/ml のストレプトアビジン (SA) バイオセンサー (FortéBio) を用いてビオチン化ヒト TIM3-IgV ドメインを捕捉した。洗浄ステップ後、ロードしたバイオセンサーを、まず 200 nM の二重特異性抗体を担持するサンプルウェル、次に 200 nM の PD-1 抗原を担持するウェルとの連続的な結合および解離相互作用に付した。ビオチン化ヒト TIM3-IgV ドメインをストレプトアビジンセンサーにロードした後、まず二重特異性分子、次に PD-1 抗原との連続的な相互作用に付した。結合結果を図 27A~27B に示す。

40

【0219】

【表 19】

表 7. PD-1/TIM3のためのBiSコンストラクト

説明	配列
TIM3 WT #62 scFv	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKCLEW VSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARGSYGTYYGNYFEYWGRGTLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG SQTVLTLQPPSVSVAPGKTASISCGGDNIGGKSVHWYQKPGQAPVLVI YYDSDRPSGIPQRFSGSNSGNTATLTIHRVEAGDEADYYCQVLDRRSD HWLFGCGTKLTVL (配列番号20)
PD-1 重鎖 +TIM3(WT #62) scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLE WVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARRAPNSFYEYYFDYWQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLGLKGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKCLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYGTYYGNYFEYWGRG TLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSQTVLTLQPPSVSVAPGKTASIS CGGDNIGGKSVHWYQKPGQAPVLVIYYDSDRPSGIPQRFSGSNSGNT ATLTIHRVEAGDEADYYCQVLDRRSDHWLFGCGTKLTVL (配列番号21)
BiS5 PD-1 重鎖 +TIM3(WT #62) scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLE WVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARRAPNSFYEYYFDYWQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKCLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGSYGTYYGNYFEYWGRGTLTVSSGGGGSGGG SGGGGSGGGGSQTVLTLQPPSVSVAPGKTASISCGGDNIGGKSVHWYQ QKPGQAPVLVIYYDSDRPSGIPQRFSGSNSGNTATLTIHRVEAGDEADY YCQVLDRRSDHWLFGCGTKLTVLGGGGSGGGSGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG K (配列番号22)

10

20

30

40

【0220】

【 0 2 2 1 】

10
20
30
40

【表 2 1】

DuetMab TIM3 HC Knob	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARGSYGTYYGNYFEYWGRGTLTVSSASTKGPSVCPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSVDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号27)
----------------------------	---

10

【0 2 2 2】

腫瘍特異的殺傷活性アッセイ

Rosenberg クローン 黒色腫殺傷アッセイ

Rosenberg Clone: JR6C12 および黒色腫細胞株: Me1324 を用いて、TIM3/PD-1 二重特異性結合分子および親 TIM3 抗体の一般的な細胞殺傷活性を試験した。

20

【0 2 2 3】

一般的なアッセイプロトコル

JR6C12 は、エフェクターとして機能し、黒色腫患者から拡大され、かつ gp100-黒色腫抗原に対して特異的なヒト CD8+T 細胞株である。治療能力を評価するために、Me1624 腫瘍細胞を蛍光標識してから、エフェクター (JR6C12) ならびに TIM3 およびまたは PD-1 に結合する候補抗体と一緒に添加した。細胞を 16 時間同時培養した。図 28A に示す複数のパネルは、抗 PD1 と組み合わせて、または PD-1/TIM3 二重特異性分子 (表 7 に記載の通り) としてのいずれかで TIM3-62 を添加すると、T 細胞活性化および腫瘍殺傷を増強することを視覚的に示す図を提供する。

【0 2 2 4】

さらに、図 28B~28C に示すように、PD-1/TIM3 二重特異性分子は、(b) 腫瘍細胞生体染色剤取り込みおよび (c) IFN γ 分泌により評価されるように、抗 TIM3、抗 PD-1 またはアイソタイプ対照単剤療法と比較して最大の腫瘍殺傷効力を示す。

30

【0 2 2 5】

クローン 62 に加えて、表 2 で上に同定された親配列を用いて、DuetMab フォーマットの、PD-1 および TIM3 に結合する別の二重特異性結合タンパク質を作製した。PD-1/TIM3 DuetMab は、以下の表 8 に示す配列を用いて作製した。TIM3 アームの配列は、クローン 62 の親和性成熟変異体である O13-1 から取得し、抗 PD-1 アームの配列は、LO115 から取得したが、これは、前述した PD-1/CTL A-4 DuetMab 二重特異性抗体に使用した PD-1 アームと同一である。PD-1 (LO115)/TIM3 (O13-1) 二重特異性抗体は、PD-1/TIMB i S3 および B i S5 との比較を含め、以下に論じるように評価した。

40

【0 2 2 6】

【表 2 2】

表 8. PD-1/TIM3のための DuetMabコンストラクト

説明	配列
DuetMab PD-1(LO115) LC アミノ酸	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRHMVWYQQKPGQA PRLLIYLTNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQWSS NPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (配列番号7)
DuetMab PD-1(LO115) LC 核酸	CAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACCCTGTCCCTGAGCCCTGG CGAGAGAGCCACCCTGAGCTGCTCCGCCTCCTCCAAGCACACCAAC CTGTACTGGTCCCGGCACATGTACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCC AGGCCCCCTCGGCTGCTGATCTACCTGACCTCTAACCGGGCCACCGG CATCCCTGCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCAGACTTCACCC TGACCATCTCCAGCCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTG CCAGCAGTGGTCCCTCCAACCCCTTCACCTTCGGCCAGGGCACCAAG CTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCC TGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGT GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACG CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACA GGGGAGAGTGT (配列番号8)
DuetMab PD-1(LO115) HC アミノ酸	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGMHWVRQAPGKGLE WVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARRAPNSFYEYYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEF EGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PASIEKTIKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号9)

10

20

30

【 0 2 2 7】

【 0 2 2 8 】

10

20

30

【表 2 4】

DuetMab TIM3(O13-1) LC 核酸	AGCTACGTGCTGACGCAGCCGCCGTCAGTGTCAGTGGCCCCAGGAA AGACGGCCAGGATTACCTGTGGGGGAGACAACATTGGAGGTAAAA GTGTTCAGTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGTTGGT CATCTATTATGATAGTGACCGGCCCTCAGGCATCCCTGAGCGATTCT CTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGT CGAAGCCGGGGATGAGGCCGATTATTACTGTCAGGTGTTGGATCGT CGTAGTGATCATTTCCTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCC TAGGTCAGCCCAAGGCGGCGCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTG CTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATA AGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATA GCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAAC AAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGC CTGAGCAGTGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCA TGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAAGTGTC A (配列番号29)	10
DuetMab TIM3(O13-1) HC アミノ酸	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARGSYGTYGNYFEYWQGTLVTVSSASTKGPSVCPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPSVDKTHTCPPCPAPEFE GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP ASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号30)	20
BiS3 PD- 1(LO115)/TIM3(O13 -1) HC アミノ酸	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLE WVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARRAPNSFYEYFDYWQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPSVDKTHTCPPCPAPEF EGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKCLEWVSAISGSGGSTYYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYGTYGNYFE YWQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSYVLTQPPSVSVAPG KTARITCGDNIGGKSVHWYQQKPGQAPVLVIYYDSDRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVLDRRSDHFLFGCGTKLTVL (配列番号89)	30
BiS3 PD- 1(LO115)/TIM3(O13 -1) LC アミノ酸	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRHHMYWYQQKPGQA PRLLIYLTSNRATGIPARFSGSGSDFTLTISSELPEDFAVYYCQQWSS NPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEEKHK VYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (配列番号90)	40

【表 2 5】

BiS5 PD-1(LO115)/TIM3(O13-1) HC アミノ酸	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGMHWVRQAPGKGLSE WVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNALNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARRAPNSFYEEYFDYWGQGTFTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEF EGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PASIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNNGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSY AMSWVRQAPGKCLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYGTYGNYFEYWGQGLTVTVSSGGG SGGGGSGGGGSGGGGSSYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGDNIGGKS VHWYQQKPGQAPVLIYYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAG DEADYYCQVLDRRSDHFLFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK (配列番号91)
BiS5 PD-1(LO115)/TIM3(O13-1) LC アミノ酸	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRHYWYQQKPGQA PRLIYLTNSRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQWSS NPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号92)
DuetMab TIM3(O13-1) HC- 核酸	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGG GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGC TATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGT GGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGA CTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC ACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCG TGTATTACTGTGCGAGAGGGTCTATGGTACCTACTACGGAACTA CTTTGAATACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCG TCGACCAAAGGTCCGAGCGTGTGCCCCGCTGGCACCGAGCAGCAAAA GCACCTCTGGTGGCACCGCAGCACTGGGTTGTCTGGTGAAAGATTA TTTTCCGGAACCGGTTACCGTTTCTTGAATAGCGGTGCACTGACCA GCGGTGTTTCATACCTTTCCGGCAGTCTGCAGAGCAGCGGTCTGTAT AGCCTGTCTAGCGTTGTTACCGTTCGAGCAGCAGCCTGGGCACCC AGACCTATATTTGCAATGTGAATCATAAACCAGCAATACCAAAGT TGATAAACGCGTTGAACCGAAAAGCGTGGAACAAAACCTCACACGTGC CCACCGTGCCAGCACCTGAGTTCGAGGGGGGACCGTCAGTCTTCC TCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAG GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG TCAGCGTCTCACCGTCTGCACCGAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCAGCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTC TACACCCTGCCCCCATGCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCA GCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGC TCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATG CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC TTAAGCCTGTCTCCGGGTAAA (配列番号31)

【0230】

Octet 結合アッセイ (DuetMab、TIM3 アーム親和性成熟変異体)

2つの個別の抗原、PD-1およびTIM3に対する同時結合試験をOctetアッセイにより実施した。ビオチン化ヒトTIM3をストレプトアビジンセンサーにロードした

後、まずPD-1/TIM3 Duet Mab、次に可溶性PD-1抗原と連続的に相互作用させた。PBS pH7.2、3mg/mlのBSA、0.05% (v/v) Tween (登録商標) 20 (アッセイ緩衝液) 中5μg/mlのストレプトアビジン (SA) バイオセンサー (ForteBio) を用いてビオチン化ヒトTIM3を捕捉した。洗浄ステップ後、ロードしたバイオセンサーを、まずクローン62 TIM抗体の親和性成熟変異体であるTIM3アーム (O13-1) を有する、200nMでロードされたDuet Mab PD-1/CTLA-4二重特異性抗体を担持するサンプルウェル、次に200nMのヒトPD-1抗原を担持するウェルとの連続的な会合および解離相互作用に付した。結合結果を図29に示す。

【0231】

BiaCoreにより、PD-1/TIM3 Duet Mab二重特異性抗体の固有の動態も評価した。BIAcore T200計器 (BIAcore) を用いて結合実験を実施した。抗体を捕捉するためにマウス抗huIgG-Fabを2000RUの標的応答までCM5チップ上に固定化した。100nMのDuet MabまたはmAbを20μL/分で5分間流すことにより、捕捉抗体の約100応答単位を達成した。次に、50μL/分の流量で5分間抗原を順次注射した。動態パラメーター (k_{on} および k_{off}) ならびに解離定数 (K_D) を、BIAevaluation 4.1ソフトウェアを用いて非線形フィットから計算した。結合結果を表9に示す。

【0232】

【表26】

表 9. PD-1/TIM3 についての BiaCore データ

捕捉	TIM3	$k_a (M^{-1}s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$K_D (nM)$	捕捉	PD-1	$k_a (M^{-1}s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$K_D (nM)$
O13-1 IgG1-TM	ヒト	1.88E+06	7.52E-03	4.01	LO115 IgG1-TM	ヒト	3.02E+05	2.37E-04	0.79
DuetMab	ヒト	1.96E+06	8.13E-03	4.15	DuetMab	ヒト	2.95E+05	2.36E-04	0.69
O13-1 IgG1-TM	Cyno	2.79E+06	7.18E-02	25.69	LO115 IgG1-TM	Cyno	3.46E+05	2.38E-04	0.81
DuetMab	Cyno	2.98E+06	7.61E-02	25.57	DuetMab	Cyno	4.90E+05	2.15E-04	0.44

【0233】

Bis3、Bis5、およびDuet Mabを含むPD-1/TIM3二重特異性抗体は、ヒトTIM3またはヒトPD-1を過剰発現するCHO細胞に結合し (図30および表25)、PD-1およびTIM3発現 (DMF4) を図31に示す。

【0234】

【表27】

表 25

	抗TIM3 LO0131	抗PD1 LO115	Duetmab	Bis3	Bis5	Nip228 Hu IgG1TM
EC50	0.003968	NA	0.1036	0.02853	0.01603	NA
Rスクエア	0.9951	0.9792	0.9982	0.9964	0.9954	0.9804

【0235】

CMV Agリコールアッセイ

Bis3、Bis5、およびDuet Mabを含むPD-1/TIM3二重特異性抗体

10

20

30

40

50

は、アイソタイプ処置と比較してCMV抗原リコールアッセイにおいてCD8+T細胞増殖を増大した(図32A~C)。

【0236】

混合白血球反応(MLR)アッセイ

BiS3、BiS5、およびDuetMabを含むPD-1/TIM3二重特異性抗体は、混合白血球反応(MLR)アッセイにおいて、単剤および併用療法を超える活性でインターフェロン(IFN γ)分泌を増大した(図33A~D)。BiS3、BiS5、およびDuetMabを含むPD-1/TIM3二重特異性抗体は、主にPD-1を発現する(87%PD-1単一陽性)jurkat NF κ Bリポータ系列において親LO115 IgG1と同様の活性を示した(図34A~C)。

10

【0237】

要約すると、3つの二重特異性フォーマット(DuetMab、BiS3、およびBiS5)をPD-1/TIM3のために作製した。二重特異性フォーマットは、全て抗PD-1と同等であるか、またはより優れたインビトロ機能性を示し、これは、これらの分子が既存の癌免疫戦略に対して優れた利点をもたらし得ることを示唆している。

【0238】

実施例2(d)OX40/PD-L1二重特異性結合タンパク質

表2で上に同定された親配列を用いて、PD-1およびOX40に結合する下記の二重特異性結合タンパク質を作製した。BiS2、BiS3、およびBiS5として識別されるタンパク質は、以下の表10に示す配列を用いて作製し、後述するOctet結合アッセイを用いて同時結合試験について評価した。

20

【0239】

【表 2 8】

表 10. OX40/PD-L1のためのBiSコンストラクト

説明	配列
OX40 LC _v K	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIY YTSKLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGSALPWT GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号32)
OX40SLR LC _v K	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIY YTSKLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGSALPWT GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号93)
BiS2- PD-L1 - OX40 HC - 4P	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLI YDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGS LPGWTFGCGTKVEIKGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKCLEWVANIKQDGSEKYYVDS VKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDY WGQGT LVTVSSGGGSGGGGSGVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYG GSFSSGYWNWIRKHPGKGLEYIGYISYNGITYHNPSLKSRLTINRDTSKN QYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGGHAMMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTKYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VTLHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK (配列番号34)
BiS3- OX40 HC-4P-PD-L1	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGKGLEYI GYISYNGITYHNPSLKSRLTINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCAR YKYDYDGGHAMMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTKYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VTLHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGKGGGSGGGG SEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGS LPGWTFGCGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKCLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGT LVTVSS (配列番号35)

10

20

30

40

【 0 2 4 0 】

【表 2 9】

BiS5- OX40 HC-4P-PD-L1	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGKGLEYI GYISYNGITYHNPSLKSRLTINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCAR YKYDYDGGHAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGKTQTYTCNVDPKPSNTKVDKRVEPKYGPPCPAPAEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSTLSPGERATLSCRASQRVSSSYLA WYQKPKGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVY CQQYGSLPWTFGCGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKCLEWVANIKQ DGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREG GWFGELAFDYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGQPENNYKTPPVLDSD DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号36)
BiS5-OX40SLR HC- G1-N434A-PD-L1	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGKGLEYI GYISYNAITYHNPSLKSRLTINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCAR YKYDYEGGHAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGKTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWM SWVRQAPGKCLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGLTVTVSSGGGSGG GGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSTLSPGERATLSCRASQRVSSSYLA WYQKPKGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFA VYYCQQYGSLPWTFGCGTKVEIKGGGSGGGGSGQPENNYKTPPVLDSD DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHAHYTQKSLSLSPGK (配列番号94)

10

20

30

【0241】

Octet 結合アッセイ

本明細書に開示する二重特異性結合分子の結合を評価するために、Ni-NTA バイオセンサーチップを備える Octet QK および 10×キネティック緩衝液を使用した (FortéBio, Menlo Park, CA)。この特定のシリーズの二重特異性結合タンパク質の場合、His タグ付き PD-L1-Fc、his タグ付き PD-1-Fc および hOX40-Fc (ヒト組換えタンパク質) を R&D Systems (Minneapolis, MN) から購入した。全ての結合アッセイは 25℃ で実施した。

【0242】

分析前にサンプルプレート を 1000 rpm で攪拌した。Ni-NTA バイオセンサーチップを 1×キネティック緩衝液で 5 分間予め湿潤させた。1×キネティック緩衝液は、ベースライン決定のためのランニング緩衝液ならびに抗原および二重特異性抗体の希釈緩衝液としての役割も果たした。Ni-NTA バイオセンサーチップを、抗原捕捉のために 100 nM his タグ付き PD-L1-Fc (以下の (b) を参照されたい) または his タグ付き PD-1-Fc 中に約 1 分間浸漬した。抗原をコーティングしたバイオセンサーチップを各々 10 μg/ml の二重特異性抗体中に約 5 分間浸漬した後、100 nM hOX40-Fc 抗原を含有するウェルのカラム内に 2 分間移した。結合結果は、BiS2/BiS3 OX40Ab/PD-L1 分子が PD-L1-His および hOX40-Fc の両方に結合すること、ならびに BiS2 OX40Ab/PD-L1 が、BiS3 OX40Ab/PD-L1 よりも高い親和性で結合することを示している。Bi

40

50

S2 OX40Ab/PD-1を対照として使用した(図35)。

【0243】

ブドウ球菌エンテロトキシン(Staphylococcal Enterotoxin) B(SEB)アッセイ

前述したプロトコルを用いたSEBアッセイは、OX40/PD-L1二重特異性分子がBiS2およびBiS3フォーマットの両方で活性であることを示した(図36A~B)。

【0244】

PD-L1リポータアッセイ

材料:

- 細胞株および培養条件:
- ヒトPD-1 Jurkat NFATルシフェラーゼクローン2受容体
- PD-L1発現CHO scFv OKT3(UBC)(全細胞は、加湿組織培養インキュベータ内の10%FBSおよび1×pen/strep抗体含有RPMI1640培地(RPMI完全培地)中に37℃で維持した)。
- RPMI-1640、Life Technologies cat#A1049101
- 熱不活性化新生ウシ血清(FBS)、Life Technologies cat#26010074
- 完全RPMI培地:10%FBSを含むRPMI-1640
- 100×ペニシリン/ストレプトマイシン、Life Technologies cat#15140-122
- 96ウェルTC処理平底培養プレート、Costar3903、VWR cat#29444-010
- SteadyGlo Luciferase Assay System, Promega, cat#E2510
- 試験抗体
- EnVision Multilabel Plate Reader、Perkin Elmer

【0245】

方法

PD-1阻害の中和についての2細胞生体活性アッセイのために、PD-L1発現CHO scFv OKT3細胞をトリプシン処理し、温かいRPMI完全培地で中和した後、50mLのコニカルチューブ内に収集した。細胞をRTにおいて5分間380gでペレット化してから、新鮮なRPMI完全培地中に懸濁させた後、Vi細胞カウンター上でカウントした。CHO scFv OKT3細胞を発現するPD-L1を0.4e6/mLに調節し、1ウェル当たり25μL(10,000細胞)をプレートレイアウトに示すように平板培養した。細胞をプレートに3時間付着させた。その後、試験試薬(2×最終濃度)を含有する50μLのRPMIを等分してCHO細胞上に添加し、さらに1時間インキュベートした。このインキュベーションにより、CHO細胞表面上のPD-L1に結合する時間を試験試薬に与える。1時間後、PD-1発現Jurkat NFATルシフェラーゼリポータ細胞を50mLのコニカルチューブ内に収集し、RTにおいて5分間380gでペレット化し、新鮮で温かいRPMI完全培地に再懸濁させた。細胞を1.2e6/mLに調節し、PD-L1発現CHO scFv OKT3細胞および試験品目を含むウェル中に25μL(30,000)の細胞を平板培養した。

【0246】

PD-1 Jurkatリポータ細胞活性化のために細胞および試験試薬を18時間さらにインキュベートした。その後、SteadyGloルシフェラーゼ試薬を調製し、100μLを等分して各ウェルに添加した。RTで穏やかに15分間振盪(200rpmオービタルシェーカ)することによって完全な溶解を達成した。溶解後、US96発光プロ

10

20

30

40

50

トコルを用い、Envision Multilabel Plate Readerでルシフェラーゼ活性を測定した。Graphpad Prismソフトウェアを用いて、ログ〔試験試薬〕に対してルシフェラーゼRLUをプロットし、非線形回帰分析、S字状用量応答曲線の4-パラメーターフィットを用いてPD-L1拮抗のEC₅₀値を決定した。

【0247】

結果：

100 nM (PD-L1)を出発点とする5点用量滴定を用いて、OX40/PD-L1 Bis2/3をPD-L1/PD-1親およびNIP228 (G4P)対照に対して試験した。OX40-PD-L1 BisAbは、いずれも活性であり、PD-L1 (4736)親よりも強いアゴニズムを有することが明らかにされた(図37)。Bis2およびBis3フォーマットは同様に機能した。

10

【0248】

CMV Agリコールアッセイ

CMV Agリコールアッセイ(前述したプロトコルを用いる)において、Bis2およびBis3分子は、組み合わせと比較して同等の活性を示した(図38)。

【0249】

前述した結合および免疫応答アッセイの全ては、本明細書に開示する二重特異性結合分子が両方の標的分子に対して特異的な結合を呈示し、いくつかの事例では個々の単一特異性親結合分子(抗体)の組み合わせよりも高い活性を呈示し、従って免疫応答を誘導または増強することができるという例証的データを提供する。さらに、癌細胞株に対して細胞殺傷活性を有することも示される。このように、データは、これらの分子および二重特異性プラットフォーム構造が癌免疫療法薬の優れた候補となることを明らかにしている。

20

【0250】

Octet結合アッセイ(OX40 (SLR)/PD-L1 Bis5)

本明細書に開示する二重特異性結合分子の結合を評価するために、Ni-NTAバイオセンサーチップを備えるOctet QKおよび10×キネティクス緩衝液を使用した(ForteBio, Menlo Park, CA)。この特定のシリーズの二重特異性結合タンパク質の場合、Hisタグ付きPD-L1-Fc、his-タグ付きPD-1-FcおよびhOX40-Fc(ヒト組換えタンパク質)をR&D Systems (Minneapolis, MN)から購入した。全ての結合アッセイは25℃で実施した。結合結果は、Bis5 OX40Ab/PD-L1分子がPD-L1-HisおよびhOX40-Fcの両方に結合することを明らかにしている(図39)。

30

【0251】

PD-L1/OX40 Bis5は、ヒトまたはカニクイザルOX40およびPD-L1/B7H1を発現するCHO細胞に結合した(図40A~F)。PD-L1/OX40 Bis5コンストラクトの結合は、フローサイトメトリー(HyperCyt)によっても測定した(図42)。OX40 IgG4PおよびOX40/PD-L1二重特異性分子は、Jurkat OX40受容体細胞に結合した。PD-L1 IgGおよびOX40/PD-L1二重特異性分子は、NCI H358およびCHOK1 B7H1 (PD-L1)/OKT3細胞に結合した。IgGおよび二重特異性分子は、全てHEK CD32a細胞に結合した。

40

【0252】

PD-L1およびOX40受容体アッセイ

PD-L1受容体アッセイ(前述したプロトコルを用いる)において、PD-L1 scFv含有二重特異性分子および陽性対照IgGは、全て活性を示した(図42A~B)。単一アームOX40対照およびアイソタイプ対照は、このアッセイでは活性を示さなかった。EC₅₀およびヒルスロープは、抗PD-L1親対照ならびにPD-L1 Bis2、Bis3およびBis5コンストラクトについての以前のアッセイで得られた値と一致している。

50

【0253】

HEK CD32a細胞を用いるOX40リポータ遺伝子アッセイにおいて、二重特異性コンストラクトは、互いに同等の活性を有し、Fc媒介性アゴニズムが観察された（図43A～B）。OX40/PD-L1 Bis5 N434A IgG1は、OX40 IgG4PおよびMED10562（OX40 IgG1）と同等のEC₅₀活性を有した。

【0254】

発現細胞に対してCHOK1 PD-L1を用いるOX40リポータ遺伝子アッセイにおいて、OX40/PD-L1二重特異性分子は、同等のアゴニズムを示す（図44A～B）。OX40/PD-L1 Bis5 N434A IgG1は、試験したOX40/PD-L1 Bis5二重特異性Mabの他のFc変異体と同等のEC₅₀活性を有した。OX40 IgGまたはPD-L1 IgGによるアゴニズムは検出されなかった。このように、PD-L1媒介性OX40アゴニズムが実証された。

10

【0255】

OX40/PD-L1二重特異性分子を用いて腫瘍細胞とのPD-L1媒介性OX40アゴニズムが検出された（図45A～B）。OX40/PD-L1二重特異性分子は、このアッセイで等しいアゴニズムー正規曲線を示した。OX40 IgGによるアゴニズムは観察されなかったことから、OX40 IgGとPD-L1 IgGとの組み合わせに対して、二重特異性分子を使用する有益性を証明している。NCI H358 PD-L1 KO細胞によりアゴニズムは検出されなかった（図46A～D）が、これは、細胞で認められたNCI H358アゴニズムがPD-L1特異的であることを示している。

20

【0256】

ブドウ球菌エンテロトキシン（Staphylococcal Enterotoxin）B（SEB）アッセイ

SEBアッセイでは、OX40/PD-L1二重特異性分子は、OX40およびPD-L1に対する個別の抗体の組み合わせよりも高い活性を有した（図47A～D）。特に、G4Pコンストラクトは、G1コンストラクトよりも高い活性を有した。野生型、YTE含有変異体、およびN434A変異体は、同等の活性を有した。

【0257】

Treg抑制アッセイ

30

Treg抑制アッセイを実施してOX40/PD-L1二重特異性分子を試験した（図48A～D）。OX40/PD-L1二重特異性分子は、PD-L1の存在下でのみ、CD4+T_{eff}上で活性であった（図49および50）。特定の理論に拘束されるわけではないが、これは、トランスでのOX40の架橋を示すものであった。OX40/PD-L1二重特異性分子は、Treg阻害作用を抑制したが、これは、プレート固定化PD-L1への結合により架橋された場合に限られた。

【0258】

混合白血球反応（MLR）アッセイ

OX40/PD-L1二重特異性分子を試験するために、MLRアッセイを実施した（図51A～B）。OX40/PD-L1二重特異性分子は、OX40およびPD-L1に対する個別の抗体の組み合わせよりも高い活性を有した（図52A～E）。

40

【0259】

抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）アッセイ

ADCCアッセイを実施してOX40/PD-L1二重特異性分子を試験した。新しく単離したNK細胞をエフェクター細胞として、またCHOK1 PD-L1 B7H1およびCHOK1 OX40過剰発現細胞をそれぞれ標的細胞として20：1のエフェクター：標的分子（E：T）比で用いるADCCアッセイである。5時間後の標識標的細胞からのユウロピウムの放出を用いて標的細胞溶解を分析した。ADCCアッセイでは、OX40/PD-L1 Bis2およびBis5は、PD-L1またはOX40発現CHO細胞に対するADCCを媒介した（図53A～Bおよび54）。

50

【0260】

新しく単離したNK細胞をエフェクター細胞として、ならびにPD-L1およびOX40過剰発現CHO-K1をそれぞれ標的細胞として10:1のE:T比で用いてCD107a動員アッセイを実施した。NK細胞の細胞表面に対するCD107a動員は、4時間後にフローサイトメトリーにより分析した。BiS2およびBiS5 OX40/PD-L1二重特異性分子は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)アッセイにおいて、PD-L1およびOX40発現CHO細胞に対するNK細胞のCD107a動員を増大した(図55)。BiS2およびBiS5 OX40/PD-L1二重特異性分子は、OX40およびPD-L1をアップレギュレーションした活性化同種異系T細胞に対するNK細胞のCD107a動員を増大した(図56)。BiS5 OX40/PD-L1は、活性化同種異系T細胞に対する2つの異なるドナーからNK細胞のCD107a動員を増大した(図57A~B)。

10

【0261】

薬物動態および薬力学的(PK/PD)試験

OX40/PD-L1二重特異性分子のPK/PDを比較するために試験を設計した(図58)。PD-L1/OX40二重特異性分子の血清濃度-時間プロファイルをカニクイザルにおいて比較した(図59および表11)。BiS5 OX40/PD-L1 IgG1 N434A分子の平均 $T_{1/2}$ は、WT BiS5分子のそれよりも高く;クリアランス速度は、WT BiS5分子と比較してBiS5 OX40/PD-L1 IgG1 N434A分子の方が低かった。いずれの分子も血清中の可溶性PD-L1を同様に低減し、Ki67+全メモリCD4+T細胞、全メモリCD8+T細胞およびNK細胞の割合(%)に有意な増加を誘発した。

20

【0262】

【表 3 0】

表 11. BiS5-OX40/PD-L1-G1 の薬物動態パラメータ

試験物質	動物	AUClast	AUCinf	%AUCExtrap	C0	Cmax
		(ng*h/mL)	(ng*h/mL)	(%)	(ng/mL)	(ng/mL)
BiS5-OX40/PD-L1-G1 N434A	2028	5490000	6840000	19.8	82900	82300
	2033	6530000	10800000	39.7	77700	79100
	2059	6510000	9260000	29.7	94500	89800
	平均	6180000	8980000	29.7	85000	83700
	SD	597000	2000000	9.91	8610	5520
BiS5-OX40/PD-L1-G1 WT	2032	4260000	4530000	6.08	104000	101000
	2047	3670000	3900000	5.84	131000	105000
	2056	4190000	4340000	3.45	74400	74400
	平均	4040000	4260000	5.13	103000	93300
	SD	320000	324000	1.45	28200	16500
試験物質	動物	Tmax	Cl	Vss	T1/2	Rsqr
		(h)	(mL/分/kg)	(L/kg)	(h)	
BiS5-OX40/PD-L1-G1 N434A	2028	2	0.0122	0.0773	70	0.836
	2033	6	0.0077	0.0842	128	0.873
	2059	2	0.00899	0.0746	97.1	0.933
	平均	3.33	0.00963	0.0787	98.3	0.881
	SD	2.31	0.0023	0.00496	28.9	0.049
BiS5-OX40/PD-L1-G1 WT	2032	2	0.0184	0.0596	37.9	0.952
	2047	2	0.0214	0.0672	44.6	0.987
	2056	2	0.0192	0.0555	34	0.99
	平均	2	0.0196	0.0608	38.9	0.976
	SD	0	0.00154	0.00593	5.35	0.0211

【0 2 6 3】

OX40/PD-L1二重特異性分子は、アッセイLLOQより低く血清可溶性PD-L1濃度を低減した（図60）。N434A突然変異は、BiS5-OX40/PD-L1-G1の薬物動態を向上させた。特に、CLは、ほぼ半分に低減し；対応してT1/2およびAUCinfに2倍の増加が見られ；また、CmaxおよびVssは影響されなかった。これは、モノクローナル抗体のPKに対してこれまでに報告されているこの突然変異の作用と一致した。従って、BiS5-OX40/PD-L1-G1 IO BiSAbのmAb様PKに向けた進歩が達成された。BiS5-OX40/PD-L1-G1 BiSAbの血清濃度は、2週間の時点で定量下限未満（BLOQ）であったが、これは、ADAに関連していると考えられる。

【0 2 6 4】

PD-L1 OX40 BiS5群を対照（抗PcrV-Ps1対照）Ab群と比較し

10

20

30

40

50

て実質的かつ統計的に有意な増加が全メモリCD4、全メモリCD8、およびNK細胞増殖（Ki67+細胞のパーセンテージ）に認められた（図61A～F）。有意な差への傾向が全メモリCD4、全メモリCD8、およびNK細胞増殖（Ki67+）におけるPD-1 LO115とPD-L1 OX40 Bis5群との間に認められた。PD-L1 OX40 Bis5 N434A（半減期延長）バージョンとG1バージョンとの間で増殖に統計学に有意な差はなかった。PD-L1 OX40 Bis5 N434AおよびIgG1バージョンは、生物学的に活性の二重特異性分子である。

【0265】

実施例2（e）. OX40／PD-1二重特異性結合タンパク質

表2で上に同定された親配列を用いて、PD-1およびOX40に結合する下記の二重特異性結合タンパク質を作製した。BiS2およびBiS3として識別されるタンパク質は、以下の表24に示す配列を用いて作製し、後述するOctet結合アッセイを用いた同時抗原結合試験について評価した。

10

【0266】

【表 3 1】

表 24. OX40/PD-1のため BiSコンストラクト

説明	配列
PD1 LC _v K	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRHMYWYQQKPGQA PRLLIYLTNSRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQWSS NPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号:97)
BiS2- PD-1- OX40 HC -4P	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIY YTSKLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGSALPWT GCGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLQESGPGLVKPSQTL SLTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGKCLEYIGYISYNGITYHNPSLKSRI TINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQ GTLVTVSSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNANKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAPNSFYEYFDYWGQGTITVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVHLQDWN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHAEALHNHYTQKSLSLGLK (配列番号95)
BiS3- OX40 HC-4P-PD-1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQDYGMHWVRQAPGKGLE WVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARRAPNSFYEYFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSV TVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVHLQDWNKGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHAE ALHNHYTQKSLSLGLKGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTIT TCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSKLHSGVPSRFSGSGSGT DYTLTISSLQPEDFATYYCQQGSALPWTFGCGTKVEIKGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWI RKHPGKCLEYIGYISYNGITYHNPSLKSRIINRDTSKNQYSLQLNSVTP EDTAVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQGTITVTVSS (配列番号96)

10

20

30

【0267】

40

PD-1/OX40 BiS2モノクローナル抗体 (mAb) は、ヒトおよびマウスイザルPD-1ならびにヒトおよびマウスイザルOX40に同時に結合するように操作された二重特異性抗体 (図62; PD-1結合タンパク質は灰色で、OX40結合タンパク質は薄い灰色で示す) である。特定の理論に拘束されるわけではないが、提示される作用機構は、OX40およびPD-1の両方にシス結合した後のT細胞に対する二重シグナル伝達作用、T細胞同時刺激表面受容体OX40のアゴニズム、ならびに免疫抑制性PD-1の遮断を示唆している (図63)。

【0268】

Octet結合アッセイ

PD1-HisおよびヒトOX40-Fcに対するPD-1 (LO115)/OX40

50

B i S 2 m A b の異なる 2 つのロットについての同時に結合活性を示す (図 6 4)。

【0269】

O X 4 0 リポータアッセイ

P D - 1 (L O 1 1 5) / O X 4 0 B i S 2 m A b は、他の O X 4 0 アゴニストと同等の活性を示した (図 6 5 A ~ B)。タンパク質を 4 °C で保存し、直ちに使用して、3 回凍結 / 解凍し、4 °C で 7 日間保存した後、4 0 °C で 7 日間保存した。m A b の濃度に対する相対発光量として活性を記録した。0 日目、4 °C の P D 1 (L O 1 1 5) / O X 4 0 B i S 2 m A b の E C ₅₀ は約 2 n M であった。

【0270】

P D - 1 / P D - L 1 リポータアッセイ

P D - 1 (L O 1 1 5) / O X 4 0 B i S 2 m A b は、他の P D - 1 アゴニストと同等の活性を示した (図 6 6 A ~ B)。タンパク質を 4 °C で保存し、直ちに使用して、3 回凍結 / 解凍し、4 °C で 7 日間保存した後、4 0 °C で 7 日間保存した。m A b の濃度に対する相対発光量として活性を記録した。0 日目、4 °C の P D 1 (L O 1 1 5) / O X 4 0 B i S 2 m A b について E C ₅₀ は約 1 n M であった。2 組の一次ヒトインビトロ効力アッセイを実施した；抗原リコール T 細胞アッセイおよびブドウ球菌エンテロトキシン B (S E B) を用いた T 細胞同時刺激。

【0271】

ブドウ球菌エンテロトキシン (S t a p h y l o c o c c a l E n t e r o t o x i n) B (S E B) アッセイ

S E B アッセイにおいて、P D - 1 (L O 1 1 5) / O X 4 0 B i S 2 m A b は、培養 3 日後に細胞の上清中に検出された I L - 2 のレベル増加を誘導した (図 6 7)。従って、P D - 1 / O X 4 0 B i S 2 m A b は、そのヒト標的抗原に同時に結合することができ、かつ T 細胞をインビトロで同時刺激することができる。

【0272】

抗原リコールアッセイでは、P D - 1 / O X 4 0 B i S 2 m A b は、親 m A b および親 m A b の組み合わせと比較してインターフェロン (I F N) γ のレベル増大を駆動した (図 6 8 および 6 9)。

【0273】

C M V A g リコールアッセイ

C M V A g リコールアッセイ (前述のプロトコルを用いる) の結果、B i S 2 および B i S 3 分子は、組み合わせと比較して等しい活性を示さなかった (図 7 0)。データは、P D - 1 / O X 4 0 B i S 2 I g G 4 P m A b がインビトロおよびインビボで活性であることを示している。P D - 1 / O X 4 0 B i S 2 と構造が異なる P D - 1 / O X 4 0 B i S 3 は、検出可能な程度に活性ではなかった。従って、P D - 1 / O X 4 0 B i S 3 (活性ではない) は、B i S 2 (活性) と異なる。

【0274】

薬物動態および薬力学的 (P K / P D) 試験

カニクイザルは、P D - 1 / O X 4 0 B i S 2 m A b の機能的活性を試験するための薬理学的に適切な非臨床的な種であると考えられた。P D - 1 / O X 4 0 B i S 2 m A b の薬物動態 (P K) および薬力学 (P D) をカニクイザルの非 G L P (G o o d L a b o r a t o r y P r a c t i c e s) 試験で評価した。0 . 1 m g / k g ~ 3 0 m g / k g の用量範囲にわたって単回静脈内 (I V) 投与後のカニクイザル (n = 3 ; 雄) において、P D - 1 (L O 1 1 5) / O X 4 0 B i S 2 m A b P K および P D (K i 6 7 陽性 C D 4 + および C D 8 + 全メモリ T 細胞の %) を評価した。投与前、投与から 1 日、8 日、1 1 日および 1 5 日後に P B M C を採取し、凍結保存および解凍した後、フローサイトメトリーにより分析した。要約すると、P D - 1 (L O 1 1 5) / O X 4 0 B i S 2 m A b は、0 . 6 ~ 1 . 7 日の短い半減期と共にほぼ線形の P K を示した (図 7 0 ; 表 1 2)。

【0275】

【表 3 2】

表 12. PD1(LO115)/OX40 BiS2 mAb の平均薬物動態パラメータ

用量 (mg/kg)	C _{max} (ug/mL)	AUC _{last} (日*ug/mL)	AUC _{INF} (日*ug/mL)	CL (mL/日/kg)	T _{1/2} (日)	V _{ss} (mL/kg)
0.1	2.0 (0.5)	1.6 (0.3)	1.7 (0.3)	60.2 (9.0)	0.6 (0.1)	47.4 (18.3)
1	25.1 (3.1)	24.8 (7.5)	25.1 (7.3)	41.8 (10.4)	0.9 (0.3)	43.2 (17.4)
10	211 (19)	203 (9.2)	207 (18.0)	48.6 (4.2)	1.7 (0.2)	72.7 (8.8)
30	607 (83)	576 (49)	577 (61)	52.3 (5.5)	1.5 (0.2)	85.6 (4.3)

値は、平均 (標準偏差)として表示する。

AUC_{last} = 最後の測定可能な濃度までの濃度-時間曲線下の面積;

AUC_{INF} = 無限時間までの濃度-時間曲線下の面積;

C_{max} = 最大観測濃度;CL: 全身クリアランス;

T_{1/2} = 半減期;V_{ss}: 最終相分布容積;

V_{ss}: 定常状態分布容積

【0 2 7 6】

平均ピーク濃度 (C_{max}) は、0.1 mg/kg で 2.0 µg/mL から 30 mg/kg で 607 µg/mL まで用量にほぼ比例して増加した。AUC_∞ は、0.1 mg/kg で 1.7 µg・日/mL から 30 mg/kg で 577 µg・日/mL まで用量にほぼ比例して増加した。平均血清クリアランスは、41.8 mL/日/kg ~ 60.2 mL/日/kg の範囲であった。定常状態分布容積は、43.2 mL/kg ~ 85.6 mL/kg の範囲であった。PD 結果 (図 7 1) は、CD4+全メモリT細胞増殖 (Ki67) の用量依存的増大、および CD8+全メモリT細胞増殖 (Ki67) の増大を示した。カンクイザル血清中の PD-1/OX40 の定量について代表的な標準曲線を示す (図 7 2)。

【0 2 7 7】

実施例 3. BiSAb コンストラクトの物理的および化学的安定性

他の二重特異性結合タンパク質構造戦略およびプラットフォームと比較して、本明細書に記載する BiSAb コンストラクトの物理的および化学的安定性を評価するために一連の実験を実施した。特に、以下に述べる一連の安定性試験により、BiSAb の安定性に対する様々な pH 範囲の作用 (たとえば、加水分解、フラグメント化、凝集、熱安定性) を明らかにすると共に分析した。様々な BiSAb フォーマットの異なる例示的实施形態について、データが示すように、本明細書に開示する BiSAb (以下の試験では「BiS5」として識別され、表 1 3 に示すように D/H フォーマットである) は、他の全ての BiSAb 構造モチーフと比較して予想外で驚くべき物理的および化学的安定性を示した。

【0 2 7 8】

【表 3 3】

表 13. BiS5安定性試験コンストラクト

コンストラクト	配列
D IgG: LC10 scFv: 2F4 SN-(scFv)-G アミノ酸	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHDMHWVRQATGKGLE WVSGIGTAGDTYYPDSVKGRFTISRENAKNSLYLQMNSLRAGDTAVY YCARDRYSPTHYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSV SSYLGWYQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQ SEDFAVYYCQYQNWPLLTFGCGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSGGG GSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPYMMQWVRQAPGKGL EWVSSIWPSGGKTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARVRRGGATDYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSL SLSPGK (配列番号37) V領域は下線で示し、リンカーはイタリック体である。配列は、 次の通りである:LC10VH、CH1、ヒンジ、CH2、CH3 (N-末端)、 L1-2F4VL-リンカー-2F4VH-L2、CH3 (C-末端)
H IgG: 2F4 scFv: LC10 SN-(scFv)-G アミノ酸	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPYMMQWVRQAPGKGLE WVSSIWPSGGKTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARVRRGGATDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVSVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGGGGSGGGGSDIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSISSWLA WYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDE ATYYCKQYADYWTFGCGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGSEVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHDMHWVRQATGKCLEWVS GIGTAGDTYYPDSVKGRFTISRENAKNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCA RDRYSPTHYYGMDVWGQGTITVTVSSGGGSGGGGSGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSL SLSPGK (配列番号38) V領域は下線で示し、リンカーはイタリック体である。配列は、 次の通りである:2F4VH、CH1、ヒンジ、CH2、CH3 (N-末端)、 L1-LC10VL-リンカー-LC10VH-L2、CH3 (C-末端)

【0 2 7 9】

実施例 3. 1

本明細書に開示される BiS フォーマット (「BiS5」) と、ヒンジ領域 (たとえば、Fc および Fab 領域間) で連結された 2 つの結合ドメイン (scFv ドメイン) を含み、「BiS4」として識別される別の BiS フォーマットとの比較をさらに実施した。BiS4 および BiS5 タンパク質をチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) に発現させ、常用のクロマトグラフィー法によって精製した。上に注記したように、これらの 2 つのフォーマットは、同様の Fab および scFv 配列を有し、それらの主な違いは、scFv ドメインの位置である (本明細書に述べるように、BiS4 について、scFv は、ヒンジ領域内に位置し; この特定の BiS5 について、scFv は、CH3 ドメイン内の S

10

20

30

40

50

NGグループ中に存在する)。精製したBiS分子をPBS緩衝液中に添加し、 $1.54 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ の消散係数を用い、NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware)を用いてタンパク質濃度を決定した。

【0280】

pHスクリーンおよび短期安定性試験

pHスクリーン試験のために、BiS4およびBiS5抗体を約 12 mg/mL まで濃縮して、6つの異なるpH条件、 20 mM コハク酸ナトリウム (pH 5.0)、ヒスチジン/ヒスチジンHCl (pH 5.5、6.0、および6.5)、ならびにリン酸ナトリウム (pH 7.0および7.5) (全て、 240 mM スクロースを含有する) に対して透析した。Slide-A-Lyzer透析カセット (10 kDa 分子量カットオフ (MWCO)、Thermo-Fisher, Rockford, Illinois)を用いて透析を実施した。透析の完了後、0.02%のポリソルベート80を加え、タンパク質の最終濃度を約 10 mg/mL に調節した。予め消毒したクリーンベンチ内の $0.22 \mu\text{m}$ フィルタ (Millipore, Billerica, Massachusetts)を用いてBiS4およびBiS5製剤を滅菌した。1ミリリットルのアリコート 3 mL のホウケイ酸ガラスI型バイアル中に分配した (West Pharmaceutical Services, Exton, Pennsylvania)。サンプルを 40°C で保存し、ゼロ時点ならびに1、2、3、および4週間の保存後、SECにより分析した。

【0281】

示差走査熱量測定 (DSC)

温度調節オートサンプラー (Malvern Instruments Ltd., Westborough, Massachusetts)に接続したVP-Capillary DSCを用いて、ゼロ時間サンプルについて示差走査熱量測定サーモグラムを取得した。サーモグラムを取得するために、 $20^\circ\text{C} \sim 100^\circ\text{C}$ の温度範囲にわたって $90^\circ\text{C}/\text{時}$ の走査速度と共に 1 mg/mL のタンパク質濃度を使用した。 $5.0 \sim 7.5$ の範囲の異なるpH条件でBiS4およびBiS5のサーモグラムからバッファーを差し引いた後、ベースライン補正した。Origin 7 SR4ソフトウェアパッケージ用のDSCプラグインを用いてデータ解析を実施した。3つの遷移を有する多状態モデルに実験結果を当てはめて、融解温度 (T_m) 値を計算した。第1の温度遷移の熱容量 (C_p) 値が $500 \text{ cal mol}^{-1} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ に達した点を開始温度 (T_{onset}) とみなした。

【0282】

高性能サイズ排除クロマトグラフィー (HP-SEC)

サイズに基づいてモノマーから凝集体およびフラグメント種を分離するために、 $7.8 \times 30 \text{ cm}^2$ 、 $5 \mu\text{m}$ 、 $250 \text{ \AA}$ 、Tosho TSKgel G3000SWx1 (TOSOH Biosciences, King of Prussia, Pennsylvania)で $200 \sim 400 \text{ nm}$ UV吸収スペクトルを記録することができる光ダイオードアレイ検出器および対応するガードカラムを備えるAgilent高性能液体クロマトグラフィーシステムを用いて安定性サンプルを分析した。種を分離するために、 0.1 M 無水リン酸水素二ナトリウム、 0.1 M 硫酸ナトリウム、 0.01% アジ化ナトリウムを含有する移動相、pH 6.8および $1 \text{ mL}/\text{分}$ の流量を使用した。注射されるタンパク質の量は、約 $250 \mu\text{g}$ であった。 280 nm の吸収スペクトルを用いてBiS4およびBiS5の分離をモニターした。可溶性凝集体 (多量体および2量体)、モノマー、およびフラグメントのピーク面積を定量した。次に、これらの種の各々のパーセンテージを計算し、インキュベーション時間に対してプロットすることにより、動態プロットを作成した。各動態プロットの傾きを計算することにより、毎月のモノマー喪失、フラグメント化および凝集の速度についてのpHプロファイル曲線を作成した。

【0283】

BiS4およびBiS5の熱安定性

キャピラリー型DSCを用いて取得し、6つの異なるpH条件で作成したサーモグラム

の解析から、B i S 4およびB i S 5の熱安定性に対するpHの作用を評価した。図74Aおよび74Bは、それぞれpH 5.0～7.5までのB i S 4およびB i S 5のDSCサーモグラムを重ねて示す。図73に示すように、各サーモグラムは、遷移温度 T_m1 、 T_m2 、および T_m3 による3つの熱変性事象を示す。第1の遷移(T_m1)は、 C_H2 およびs c F vドメインの同時変性と関連すると考えられ、第2(T_m2)および第3(T_m3)遷移は、 C_H3 およびF a bドメインの変性と関連する。いずれのフォーマットについても、最大6.5までのpHの増加と共に、 T_{onset} 、 T_m1 、 T_m2 、および T_m3 の増加が観察された(図73A、73B、73Eおよび以下の表14)。B i S 4およびB i S 5について、全てのpH条件で T_{onset} 、 T_m2 、および T_m3 に差は認められなかった(図73Eおよび表15)が、これは、ヒンジ領域または C_H3 ドメインいずれかにおけるs c F vの存在が C_H3 およびF a bの熱安定性に影響を与えないことを示すものである。興味深いことに、全てのpH条件で T_m1 のわずかな増加がB i S 5について観察され、これは、s c F vが C_H3 ドメイン内に位置する場合、s c F v、 C_H2 のいずれかまたはその両方の熱安定性の増加を示している。

【0284】

【表34】

表 14: キャピラリー型DSCにより測定した、BiS4およびBiS5の開始温度(T_{onset})

ならびに融解温度(T_m1 , T_m2 , and T_m3)に対するpHの作用

pH	BiS4				BiS5			
	T_{onset}	T_m1	T_m2	T_m3	T_{onset}	T_m1	T_m2	T_m3
5.0	56.3	67.8	81.9	84.1	55.9	69.5	81.8	83.9
5.5	56.8	67.8	81.6	83.8	57.0	69.4	81.7	83.7
6.0	59.3	69.3	83.1	85.3	59.4	70.7	83.1	85.2
6.5	60.6	70.3	83.8	86.0	60.6	71.6	83.8	85.9
7.0	60.6	70.2	82.2	84.7	59.9	71.2	81.5	84.3
7.5	60.3	70.0	81.5	84.2	59.6	71.0	81.0	83.9

【0285】

B i S 4およびB i S 5の物理的および化学的安定性

異なるpH値(5.0～7.5)でB i S 4およびB i S 5フォーマットの物理的および化学的安定性を40℃で最大4週間評価した。「ゼロ時間」でのH P－S E Cクロマトグラムを用いて、他の時点のH P－S E Cクロマトグラムの総面積、モノマー、凝集体、およびフラグメント含量を比較した。4週間と比較した、pH 7.5ゼロ時間でのB i S 4およびB i S 5の代表的なクロマトグラムを図74Aに示す。全てのサンプルは、主として、低レベルの可溶性凝集体を含み、かつフラグメントを含むまたは含まないモノマーを含有する。ゼロ時間(実線)でサンプルの大部分はモノマーであり、若干の濃度差によると思われる2つのサンプル間のピーク高さのわずかな違い以外に顕著な違いはない(図74A)。点線は、40℃で4週間の保存後に同じpH条件で両方のフォーマットのH P－S E Cクロマトグラムを重ねて示す。加速した温度ストレス条件下でいずれのフォーマットもさらなるピーク、早期溶離ピーク(多量体種)、モノマーの減少、およびフラグメントレベルの増加を示す(図74A)。フラグメント化によるモノマーの喪失は、B i S 5と比較してB i S 4でより顕著であったが、これは、B i S 5の方が化学的に安定していることを示す。それらの構造、考えられるフラグメント化部位、および保持時間に基づき、小さいフラグメントピーク(R T約10.8分)がF a bであり、大きいフラグメントピーク(R T約9.8分)およびショルダーピーク(R T約8.7分)が、それぞれs c F vを含むF a b、ならびにF a b、s c F v、およびF cを含むその対応する高分子量フラグメント(H M W F)であると推測される。

【0286】

B i S 4 および B i S 5 の物理的および化学的安定性に対する s c F v の位置の影響をさらによく評価するために、各々の種の総面積の割合 (%) を p H 7. 5、4 0 °C でゼロ時間および4週間について棒グラフにプロットした(図74B)。図74Bに示すように、ゼロ時間では、B i S 4 および B i S 5 のモノマー純度は類似している。最大4週間40 °C でインキュベートしたサンプルは、形成されたフラグメントの種類および程度に有意な差を示した。B i S 4 の場合、11. 8 %、7. 2 % および 3. 5 % のショルダーピーク(R T 約 8. 7 分)、大きいフラグメント(R T 約 9. 8 分) および小さいフラグメント(R T 約 10. 8 分) がそれぞれ形成された(図74B)。驚くべきことに、B i S 5 サンプルは、恐らく s c F v がドメインの両側から F c にテザリングしたために、わずか1. 4 % の小さいフラグメント(R T 約 10. 8 分) のみを示した。

10

【0287】

図75A～75Cは、p H 7. 5 サンプルについて40 °C でインキュベートしたB i S 4 およびB i S 5 の凝集、フラグメント化およびモノマー喪失の速度論を示す。B i S 4 サンプルは、B i S 5 に比べて速いモノマーの喪失速度を示した(図75A)。p H 7. 5 でのB i S 4 およびB i S 5 のモノマーの喪失速度は、それぞれ毎月27. 4 % および毎月4. 5 % であった(図75A)。B i S 4 の場合、モノマー喪失の大部分は、毎月23. 9 % であったフラグメント化に起因し、これより程度は低い、3. 5 % / 月であった凝集によるものであった(図75Bおよび75C)。興味深いことに、B i S 5 の場合、凝集は、フラグメント化速度(1. 7 % / 月)と比較してやや高い速度(2. 8 % / 月)であると思われる(図75B～75C)。

20

【0288】

B i S 4 およびB i S 5 フォーマットの物理的および化学的安定性、毎月のモノマー喪失、フラグメント化および凝集速度に対するp Hの作用のさらなる分析を、6つのp H条件に対して上記の値をプロットすることにより実施した(図76A～76C)。p H 5. 0～7. 5 の範囲の6つのp H条件の全てを通して、モノマー喪失速度は、B i S 4 よりもB i S 5 フォーマットの方が低く(図76A)、これは、本明細書に開示するB i S 5 フォーマットが他の二重特異性タンパク質フォーマットよりも予想外に優れた物理的および化学的安定性を有することを示唆している。B i S 4 の場合、モノマー分解の大部分は、さらに低いp H条件でのフラグメント化によるものであった(図76B)。B i S 5 は、試験した全てのp H条件において、B i S 4 よりも低いフラグメント化速度を示した。驚くべきことに、B i S 5 のフラグメント化速度は、広いp H範囲にわたって平坦であり、B i S 4 よりも低いと思われる。いずれかの特定の理論に拘束されるわけではないが、B i S 5 で観察された比較的低いフラグメント化速度は、それをF c に連結するs c F v のいずれかの末端のG₄Sリンカーに起因し得る。F c と連結させるG₄Sリンカーの一方でのフラグメント化は、他方のG₄Sリンカーを介してF c に依然として連結している可能性があるため、s c F v を放出しないであろう。B i S 4 およびB i S 5 において、凝集速度は、試験した全てのp H条件を通して類似していると思われ(図76C)、これは、s c F v の位置が凝集動態に最小限の影響をもたらし、これは、キャピラリー型DSCを用いて測定された通り、全てのp H条件で2つのフォーマット間のT_{onset}に変化が認められなかったことによっても支持される(図73Eおよび前述の表14)。p H 7. 5 および40 °C (時間=0)では、分子のいずれも明らかなフラグメント化を示さなかった(図77A)が、40 °C で2週間の保存後の同じ条件下ではB i S 4 について明らかなフラグメント化が観察され、B i S 5 についてわずかなフラグメント化が認められる(図77B)。B i S 4 およびB i S 5 のいずれも、低い(5. 5) p Hではフラグメント化および凝集が低下したが、B i S 5 は、いずれのp H値でもフラグメント化および凝集の両方で優れた性能を有する(図78)。この実験のシリーズは、本明細書に開示するB i S 5 がB i S 4 よりも優れた化学的安定性を有し、B i S 4 と同様の物理的安定性を有することを実証している。

30

40

【0289】

50

実施例 3. 2

本明細書に開示され、コンストラクト A～H として識別される二重特異性結合タンパク質の様々な実施形態の物理的および化学的安定性を評価するためにさらなる試験を実施した（たとえば、上の表 13 および関連実施例）。以下に記載するように、DSC、加速保存安定性、ならびに FcRn および FcγR 結合アッセイを用いてこれらのコンストラクトを分析した。

【0290】

示差走査熱量測定分析

このデータセットのための DSC 実験は、Microcal VP-DSC 走査マイクロ熱量計 (Microcal) を用いて実施した。DSC に使用する溶液およびサンプルは、全て 0.22 μm フィルタを用いて濾過し、熱量計にロードする前に脱気した。DSC 試験に使用する抗体は、分析 SEC により決定して >98% モノマーであった。DSC 分析前に全てのサンプルを 25 mM ヒスチジン-HCl (pH 6.0) 中で十分に透析した（少なくとも 3 回の緩衝液交換）。この透析からの緩衝液を次の DSC 実験のための標準緩衝液として用いた。サンプル測定前にベースライン測定値（緩衝液対緩衝液）をサンプル測定値から差し引いた。透析したサンプル（濃度 1 mg/ml）をサンプルウェルに添加し、DSC 測定を 1 °C/分の走査速度で実施した。Microcal から提供された Origin (商標) DSC ソフトウェアを用いてデータ解析およびデコンボリューションを実施した。非二状態モデルを用いてデコンボリューション解析を実施し、100 反復サイクルを用いて最良適合を取得した。T_{onset} は、サーモグラムが非ゼロの傾きを有することが明らかとなる定性温度として定義され、T_m は、組における分子の半分が変性される温度として定義され、これは、サーモグラムでの各ピーク最大値に対応する温度値として計算される。

【0291】

異なるコンストラクトの結果を図 79 に示す。一般に、scFv として 2F4 を含むコンストラクト A、C、D は、scFv として LC10 を含むコンストラクト E、G、H と比較すると低い T_{M1} を有する。特定の理論に拘束されるわけではないが、T_{M1} 値の差は、2F4 可変ドメインに対して、LC10 scFv ドメインの本質的に優れた熱安定性に起因すると考えられる。これらのデータは、scFv として 2F4 を有するコンストラクト A～D が、scFv として LC10 を有するコンストラクト E～H よりも熱安定性が低いであろうことを示唆している。

【0292】

加速保存安定性分析

コンストラクトの濃度を 1 mg/mL に正規化した。1 mL の各二重特異性コンストラクトまたは IgG 対照を 1.5 mL のエッペンドルフチューブに等分して導入した。サンプルを静的インキュベータにおいて 45 °C で 2 週間インキュベートした。3、7、および 14 日時点でサンプルを分析し、安定性について評価した。各時点で外観検査を実施してあらゆる混濁または沈殿の増大を記録した。0.2 μm スピナラムを用いてサンプルを濾過し、120 μL のサンプルを等分して HPLC に導入し、バイアルの底に気泡がないことを確認した。次に、泳動用緩衝液として 0.1 M リン酸ナトリウム、0.1 M 硫酸ナトリウム (pH 6.8) を含む TSK-GEL G3000SW_{XL} (300 × 7.8 mm) Tosoh Bioscience カラムを用いて、凝集および分解についてチェックするために Agilent 1100 シリーズ HPLC-SEC でサンプルを試験した。60 μL のサンプルを注射し、1 mL/分の流量で流した。モノマー保持時間 (分)、総ピーク面積、%モノマー、%凝集体、%フラグメント、%モノマー喪失を取得し、解析的 SEC 分析に使用した。結果を表 15 にまとめる。

【0293】

【表 3 5】

表 15: 加速安定性試験

コンストラクト	T _M 1 (°C)	モノマー % 0日目	モノマー % 0日目	凝集% 0日目	凝集% 7日目	分解% 0日目	分解% 7日目
A	57.11	97.1	68.4	2.2	30.0	.64	1.7
C	59.01	80.4	79.7	9.7	20.4	0.0	0.0
D	58.82	92.2	90.8	7.2	8.6	0.5	0.6
E	65.83	91.3	91.2	1.7	0.0	7.0	8.2
G	68.7	99.3	99.1	0.0	0.0	0.7	0.9
H	67.5	99.4	99.2	0.0	0.0	0.6	0.8

10

【0 2 9 4】

本明細書に記載するように、前述のコンストラクトにおける s c F v ドメインの位置は次の通りである（「-」は、s c F v を示す）：A および E は、I S - R T P であり；B および F は、A K - G Q P であり；C および G は、S - N G であり；D および H は、S N - G である。様々な T_M 値は、下記ドメインと関連している：T_M 1 = C H 2 / s c F v；T_M 2 = F a b；T_M 3 = C H 3。データは、I S R T P (A) および S N G (C) ループに挿入された 2 F 4 s c F v を有するコンストラクト A および C が、同じ位置に挿入された L C 1 0 s c f v を有するコンストラクト E および G よりも凝集しやすいことを示す傾向がある。この観測は、s c F v ドメインの配列アイデンティティおよび挙動が二重特異性結合タンパク質コンストラクトの安定性に作用をもたらし得ることを示唆している。さらに、以上のことから、2 F 4 s c F v を含有するコンストラクト D は、A および C と同様の低い安定性を有することを予測することができるが、S N G ループに 2 F 4 s c F v を挿入すると、分子を安定化し、凝集体を形成する傾向を低減するようである。総合的に考えると、この加速安定性試験は、F c 領域内の s c F v 配列および位置が B i S A b コンストラクトの安定性においてかなり重要な役割を果たし得ることを示している。

20

30

【0 2 9 5】

F c R n および F c γ R 結合分析

B I A c o r e 3 0 0 0 計器 (B I A c o r e) を用いて結合実験を実施した。抗体を捕捉するために 1 0 0 0 R U I s d H (F a b) 抗原を C M 5 チップに固定化した。1 0 0 nM の B i S A b コンストラクトまたは m A b 対照を 2 0 μ L / 分で 5 分間流すことにより、抗体を捕捉した。5 uM h u F c R n または F c γ R I、I I a、I I b、I I I a - 1 5 8 V または I I I A 1 5 8 F を 5 μ L / 分で 2 0 分間流した。p H 6. 0 の P B S + 5 uM E D T A 中で F c R n 結合を実施すると共に、p H 7. 4 の P B S + 5 uM E D T A 中でも F c R n 結合を実施した。

【0 2 9 6】

コンストラクト A、C、D、E、G および H を F c R n 結合について評価した。二重特異性コンストラクト E および H の各々について、ならびに F c R n に対する 2 F 4 I g G 結合について代表的なデータを図 8 0 に示す。C H 2 - C H 3 境界面の下流に s c F v を有するコンストラクトは、F c R n 結合を保持することがわかる（たとえば、D および H コンストラクト）。C H 2 - C H 3 境界面上流の I S R T P ループ内に位置する s c F v を有するコンストラクトは、検出可能な F c R n 結合を除去すると思われる（たとえば、A および E コンストラクト）。I S R T P ループは、F c R n 結合に重要であることがわかっている F c (M 2 5 2 Y / S 2 5 4 T / T 2 5 6 E) における既知の半減期延長 Y T E 突然変異の領域内にある。

40

【0 2 9 7】

50

コンストラクトA、C、D、E、G、およびHをFcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa-158F、およびFcγRIIIa-158Vとの結合について試験した。FcγRIIIa-158Vに対するコンストラクトE、G、およびHの結合について代表的なデータを図81に示す。試験した全てのコンストラクトは、FcγRとの結合を保持したが、親和性が異なっていた（図81、差し込み図）。表16は、FcγRに対する様々なコンストラクトの観察された結合傾向を示す。

【0298】

【表36】

表 16: FcγR 結合傾向

FcγRI	FcγRIIa	FcγRIIb	FcγRIIIa158F	FcγRIIIa158V
D>C>A	D>C>A	D>C>A	D>C>A	D>C>A
H>G>E	H>G>E	H>G>E	H>G>E	H>G>E

【0299】

CH2-CH3境界面の下流のSNGループに挿入されたscFvを有する他のコンストラクト（C、D、G、およびH）と比較して、CH2-CH3境界面上流のISRTPLループ内に挿入されたscFvを有するコンストラクト（AおよびE）とのFcγR結合に認められる違いは、一貫して低いFcγR結合を示す。

【0300】

コンストラクトAおよびEのFcRn結合を改善または回復することができるか否かを評価する試みは、Fc領域への半減期延長ループ（N3）を導入することによって実施した。図82は、代表的なデータを示し、Eコンストラクトについて、BiS5Ab EまたはN3ループが導入されたコンストラクトE（BiS5Ab E+N3）のいずれもFcRnと結合することができなかったことを示す。さらに、N3ループにLC10 scFvを挿入し（N3 scFv）、ISRTPLループをインタクトに維持しても、FcRn結合は、検出可能レベル未満に低下した。これらのデータは、少なくともEコンストラクトの場合、そうでなければ本明細書に開示するコンストラクトの各々について、ISRTPLループおよびN3ループ（存在する場合）のいずれも、FcRn結合を保持するためにインタクトかつ非修飾に維持する必要があることを示している。

【0301】

実施例3.3

BiS4と、本明細書に開示する二重特異性結合コンストラクト（BiS5）との比較以外に、他の3つのBiS構造モチーフプラットフォームを評価するために試験を実施し、BiS1、BiS2、およびBiS3として識別された（図83を参照されたい）。図83を参照して理解されるように、これらのプラットフォームは、1つの結合ドメイン（scFvドメインとして示す）の位置に関して変化する。5つのモチーフのうち、BiS4およびBiS5のみが、大きいタンパク質との結合点として2つのリンカー部分を含み、それ以外（BiS1、BiS2、およびBiS3）は、単一のリンカーにより結合される。

【0302】

手短には、上の実施例3.1および3.2で述べた技術を用いて各コンストラクトの代表的な分子を安定性について分析した。各コンストラクトのサンプルをpH5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、および7.5の緩衝液に添加し、2ヵ月の期間にわたって40℃で保存した。次に、HP-SECを用いてサンプルをフラグメント化速度（図84）、凝集速度（図85）、およびモノマー喪失速度（図86）について分析した。これらの条件下において、分析から、本明細書に開示する二重特異性結合タンパク質フォーマット（「BiS5」；および表13で上に示すD/Hフォーマット）が全てのpH条件で他の全てのフォーマットより優れた物理的および化学的安定性を有することがわかった。

【0303】

また、SECデータを用いて、BiS分子の対応するフラグメントに様々なピークをマッピングした（図87）。マッピングは、フラグメント化が分子のヒンジおよびリンカー領域で起こること、フラグメントの大きさ、理論上のフラグメント化、ならびに予想されるフラグメント種が、他のフォーマットで観察されるフラグメント種に関してどのように調整されるかなどの推定に基づいて行った。各フォーマットにおいて低分子量フラグメント（LMWF）間では良好な分解があるものの、全てのフォーマットにおいてモノマーと高分子量フラグメント（HMWF）との間の分解は乏しいかまたは皆無である。表17の情報に基づき、HP-SEC技術は、モノクローナル抗体よりもはるかにBiSフォーマットのフラグメント化を過小評価すると結論付けた。代替的な分析を以下に述べるように開発した。

10

【0304】

【表37】

表 17: フラグメント化分析- SEC は、BiS フォーマットのフラグメント化速度を過小評価する

種	Mol. Wt. (kDa)	RT* (分)	40℃での%フラグメント化/月(2ヵ月)				
			BiS1	BiS2	BiS3	BiS4	BiS5
<i>BiSAb</i> モノマー ¹	200	7.9	3.4	3.4	0.8	6.2	0.5
2Fab + 1scFv + Fc ²	175	7.9	x (k ₂)	x (k ₂)	x (k ₂)		
1Fab + 2scFv + Fc ²	150	7.9			x (k ₁)	x (k ₂ ')	x (k ₁)
1Fab + 1scFv + Fc ³	125	8.7	1.7 (k ₁)	0.8 (k ₁)	-	3.4 (k ₁ ')	-
1Fab + 1scFv	75	9.7	0.9 (k ₁)	1.0 (k ₁)	-	1.5 (k ₁ ')	-
1Fab	50	10.6	-	-	0.4 (k ₁)	1.2 (k ₂ ')	0.5(k ₁)
1scFv	25	11.0	0.8 (k ₂)	0.6 (k ₂)	0.4 (k ₂)	-	-

*保持時間

20

¹モノマー喪失は、フラグメント化のみによる喪失を含み、凝集は含まない。

²速度は、HMWFとモノマーとの同時溶離のために過小評価され得る。

³ショルダーピークの速度は、統合低下のために変動し得る。

30

【0305】

(i) 分解中、小さいフラグメントが検出されたら、対応する大きいフラグメントも存在するはずであり；(ii) 安定性試験の期間中、二次フラグメント化（フラグメントのフラグメント）は有意に起こらず；かつ(iii) フラグメント化は、リンカー領域および／またはヒンジ領域で起こるという推定に基づくモル消散係数を用いて、HMWFのフラグメント化速度を計算するために代替的な分析を開発した。下記の関係に基づいてフラグメント化速度を決定した。

【数1】

40

$$\text{モノマー} = \frac{\text{LMWF}}{k_t} + \frac{\text{HMWF}}{k_{\text{LMWF}}} \quad \text{LMWF} \quad \text{HMWF}$$

$$mEC_m \quad mEC_{\text{LMWF}} \quad mEC_{\text{HMWF}}$$

$$k_{\text{HMWF}} = \frac{k_{\text{LMWF}}}{mEC_{\text{LMWF}}} \times mEC_{\text{HMWF}}$$

50

【0306】

【表38】

表 18: 推定されるフラグメント化分析

種	Mol. Wt. (kDa)	RT (分)	40℃での%フラグメント化/月(2ヵ月)				
			BiS1	BiS2	BiS3	BiS4	BiS5
<i>BiSAb</i> モノマー ¹	200	7.9	3.4	3.4	0.8	6.2	0.5
2Fab + 1scFv + Fc ²	175	7.9	3.6 (k ₂)	2.7 (k ₂)	1.9 (k ₂)		
1Fab + 2scFv + Fc ²	150	7.9			1.6 (k ₁)	4.7 (k ₂)	1.8 (k ₁)
1Fab + 1scFv + Fc ³	125	8.7	1.4 (k ₁)	1.6 (k ₁)	-	2.5 (k ₁)	-
1Fab + 1scFv	75	9.7	0.9 (k ₁)	1.0 (k ₁)	-	1.5 (k ₁)	-
1Fab	50	10.6	-	-	0.4 (k ₁)	1.2 (k ₂)	0.5(k ₁)
1scFv	25	11.0	0.8 (k ₂)	0.6 (k ₂)	0.4 (k ₂)	-	-
総 k ₁ (ヒンジ)			2.3	2.6	2.0	4.0	2.3
総 k ₂ (G4S リンカー)			4.4	3.3	2.3	5.9	-
総(k = k ₁ + k ₂)			6.7	5.9	4.3	9.9	2.3

¹モノマー喪失は、フラグメント化のみによる喪失を含み、凝集は含まない。²速度は、HMWFとモノマーとの同時溶離のために過小評価され得る。³ショルダーピークの速度は、不完全に分解されたピークの統合のために変動し得る。

【0307】

さらに、ジスルフィド結合がフラグメント化および安定性に影響をもたらしたか否かを決定するために、還元条件下のコンストラクトを用いてフラグメント化速度の分析を実施した。このアッセイの代表的なデータを（図86）に示す。還元条件下において、より高いフラグメント化速度は、BiS1を除いて全てのBiSフォーマットで観測可能であった（表19）。還元条件下でのより高いフラグメント化速度は、BiS5コンストラクト中のscFv部分がCH3領域にテザリングされていることを裏付けると結論付けられた（図89）。

【0308】

【表39】

表 19: フラグメント化分析- 還元条件

種	Mol. Wt. (kDa)	RT (分)	40℃での%フラグメント化/月(2ヵ月) (SEC/Red-GXII)				
			BiS1	BiS2	BiS3	BiS4	BiS5
<i>BiSAb</i> モノマー ¹	200	7.9	3.4/2.3	3.4/3.9	0.8/3.3	6.2/8.8	0.5/6.1
2Fab + 1scFv + Fc ²	175	7.9	x (k ₂)	x (k ₂)	x (k ₂)		
1Fab + 2scFv + Fc ²	150	7.9			x (k ₁)	x (k ₂)	x (k ₁)
1Fab + 1scFv + Fc ³	125	8.7	1.7 (k ₁)	0.8 (k ₁)	-	3.4 (k ₁)	-
1Fab + 1scFv	75	9.7	0.9 (k ₁)	1.0 (k ₁)	-	1.5 (k ₁)	-
1Fab	50	10.6	-	-	0.4 (k ₁)	1.2 (k ₂)	0.5(k ₁)
1scFv	25	11.0	0.8 (k ₂)	0.6 (k ₂)	0.4 (k ₂)	-	-

【0309】

【表 4 0】

表 20: フラグメント化分析の概要

分析方法	40℃での%フラグメント化/月(2ヵ月)				
	BiS1	BiS2	BiS3	BiS4	BiS5
標準 HPSEC	3.4	3.4	0.8	6.4	0.5
標準 HPSEC の代替的分析	6.7	5.9	4.3	9.9	2.3
非還元 GXII	3.0	2.7	2.0	6.4	1.2
還元 GXII	2.3	3.9	3.3	8.8	6.1
G4S リンカー/分子の総数	4	4	4	6	6

10

【0 3 1 0】

上に開示した安定化ジスルフィド結合の特徴をさらに調べた。結果を以下の表 2 3 および 2 4 に示す。2 つの異なる特異性に対応する二重特異性抗体を、s c F v に安定化ジスルフィド結合を含むまたは含まない B i S 4 および B i S 5 (s c F v は S N - G ループに挿入されている) フォーマットで作製した。加速安定性試験により、安定化ジスルフィド結合を含まない B i S 4 コンストラクトは、安定化 V L - V H ジスルフィド結合の導入により阻止される分解による実質的なモノマー喪失を有することがわかった。これらの結果は、B i S 5 コンストラクトの s c F v 中の安定化ジスルフィド結合の除去がその安定性に有意な作用をもたらさなかったことを示している。

20

【0 3 1 1】

【表 4 1】

表 21

抗EGFR IgG/ 抗Her2scFv	T _m 1 (°C)	モノマー% 0日目	モノマー% 14日目	凝集% 0日目	凝集% 14日目	分解% 0日目	分解% 14日目
DSBを含むBiS5	71.17	100	100	0.0	0.0	0.0	0.0
DSBを含まないBiS5	69.83	95.1	97.0	4.9	3.0	0.0	0.0
DSBを含むBiS4	72.28	100	98.4	0.0	0.0	0.0	1.6
DSBを含まないBiS4	69.34	95.7	88.7	4.3	2.3	0.0	11.1

30

【0 3 1 2】

【表 4 2】

表 22

D-LC10 IgG / 2F4 scFv	T _m 1 (°C)	モノマー% 0日目	モノマー% 14日目	凝集% 0日目	凝集% 14日目	分解% 0日目	分解% 14日目
DSBを含むBiS5	58.82	92.2	89.6	7.2	9.7	0.5	0.7
DSBを含まないBiS5	54.22	92.4	85.1	4.4	10.1	3.0	3.9
DSBを含むBiS4	66.74	99.0	98.2	1.0	0.0	0.0	1.9
DSBを含まないBiS4	56.10	87.7	83.9	2.0	7.7	0.3	8.5

40

【0 3 1 3】

上の全データに基づき、本明細書に開示する二重特異性結合タンパク質フォーマットが、試験した全てのフォーマットの中で最も安定していると思われる。さらに、B i S A b 5 は、試験した低 pH 値 (たとえば、5. 0、5. 5、および 6. 0) において、フラグメント化および凝集の両方を最小にするという点から最も安定していることがわかる。このように、本明細書に開示する B i S A b の予想外の驚くべき安定特性により、二重特異

50

性結合分子の作製に使用されている他の構造プラットフォームおよびフォーマットに対してさらなる利点がもたらされる。

【0314】

参照による援用

本明細書に言及した刊行物および特許の全ては、各個別の刊行物または特許を参照により援用するために具体的に個々に示しているかのように、参照によりその全体が本明細書に援用される。

【0315】

本開示の具体的な態様について考察してきたが、上記の記載は例示であり、限定するものではない。本明細書および下記の特許請求の範囲を検討すれば、本開示の多くの変更形態が当業者に明らかになるであろう。本開示の全範囲は、特許請求の範囲をその均等物の全範囲と共に、および本明細書をその変更形態と共に参照して決定されるべきである。

以下、本発明の実施形態を示す。

(1) 第1のエピトープに結合する第1の結合ドメイン(BD1)と、
第2のエピトープに結合する第2の結合ドメイン(BD2)と、
C_H2およびC_H3ドメインを含むFc領域と
を含むタンパク質であって、
前記Fc領域は、前記C_H2ドメイン、前記C_H3ドメイン、または前記C_H2およびC_H3
ドメインの境界面における溶媒曝露ループにBD2を含み、
前記タンパク質は、前記第1および第2のエピトープの各々に結合するために二価である
、タンパク質。

(2) 前記Fc領域は、前記C_H2ドメイン、前記C_H3ドメイン、または前記C_H2およびC_H3
ドメインの前記境界面においてアミノ酸配列における溶媒曝露ループにBD2を
含む、(1)に記載のタンパク質。

(3) 前記溶媒曝露ループは、前記C_H2ドメイン由来のアミノ酸配列を含む、(2)に
記載のタンパク質。

(4) 前記溶媒曝露ループは、アミノ酸配列ISRT P(配列番号39)を含む、(3)
に記載のタンパク質。

(5) 前記溶媒曝露ループは、前記C_H3ドメイン由来のアミノ酸配列を含む、(2)に
記載のタンパク質。

(6) 前記溶媒曝露ループは、アミノ酸配列SNGを含む、(5)に記載のタンパク質。

(7) 前記溶媒曝露ループは、前記C_H2ドメインおよび前記C_H3ドメインの前記境界面
由来のアミノ酸配列を含む、(2)に記載のタンパク質。

(8) 前記溶媒曝露ループは、アミノ酸配列AKGQP(配列番号40)を含む、(7)
に記載のタンパク質。

(9) BD2は、一本鎖可変フラグメント(scFv)を含む、(1)～(8)のいずれ
か一に記載のタンパク質。

(10) BD1は、Fabドメイン、scFv、単一ドメイン抗体、および抗体可変ドメ
インからなる群から選択される結合ドメインを含む、(1)～(8)のいずれか一に記載
のタンパク質。

(11) BD1は、Fabドメインを含む、(1)～(8)のいずれか一に記載のタンパ
ク質。

(12) 前記Fabドメインは、抗体ヒンジ領域を介して前記Fc領域に連結されている
、(11)に記載のタンパク質。

(13) 前記Fc領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、
IgE、およびIgD由来のFc領域からなる群から選択されるドメインを含む、(1)
～(8)のいずれか一に記載のタンパク質。

(14) 前記Fc領域は、変異型Fc領域を含む、(13)に記載のタンパク質。

(15) 前記Fc領域は、非グリコシル化されている、(13)に記載のタンパク質。

(16) 前記Fc領域は、脱グリコシル化されている、(13)に記載のタンパク質。

10

20

30

40

50

(17) 前記 F c 領域は、低フコシル化を有するか、または非フコシル化されている、(13)に記載のタンパク質。

(18) BD2と前記 F c 領域との間にタンパク質リンカー L1をさらに含む、(1)～(8)のいずれかに記載のタンパク質。

(19) BD2と前記 F c 領域との間に第1のタンパク質リンカー L1および第2のタンパク質リンカー L2をさらに含む、(1)～(8)のいずれかに記載のタンパク質。

(20) BD2は、タンパク質リンカー L1を介して前記 F c 領域と結合される、(1)～(8)のいずれかに記載のタンパク質。

(21) BD2は、2つのタンパク質リンカー L1および L2を介して前記 F c 領域と結合される、(1)～(8)のいずれかに記載のタンパク質。

(22) L1および L2は、 $(G_4S)_2$ (配列番号 41)、 $(G_4S)_3$ (配列番号 42)、および $(G_4S)_4$ (配列番号 43) から独立に選択される、(18)～(21)のいずれかに記載のタンパク質。

(23) N末端から C末端に以下のポリペプチドドメイン：

$V_H1 - C_H1 - C_H2$ (N末端) - BD2 - C_H2 (C末端) - C_H3

を含むキメラ重鎖を含み、および

BD1は、Fabドメインを含み、

V_H1 は、前記 Fabドメインの重鎖可変ドメインを含み、および C_H1 は、前記 Fabの重鎖定常ドメイン1を含む、(1)に記載のタンパク質。

(24) N末端から C末端に以下のポリペプチドドメイン：

$V_H1 - C_H1 - C_H2 - BD2 - C_H3$

を含むキメラ重鎖を含み、および

BD1は、Fabドメインを含み、

V_H1 は、前記 Fabドメインの重鎖可変ドメインを含み、および C_H1 は、前記 Fabの重鎖定常ドメイン1を含む、(1)に記載のタンパク質。

(25) N末端から C末端に以下のポリペプチドドメイン：

$V_H1 - C_H1 - C_H2 - C_H3$ (N末端) - BD2 - C_H3 (C末端)

を含むキメラ重鎖を含み、および

BD1は、Fabドメインを含み、

V_H1 は、前記 Fabドメインの重鎖可変ドメインを含み、 C_H1 は、前記 Fabの重鎖定常ドメイン1を含む、(1)に記載のタンパク質。

(26) BD2は、scFvを含む、(23)～(25)のいずれかに記載のタンパク質。

(27) 前記 scFvは、N末端から C末端に、

V_H2 - ポリペプチドリンカー - V_L2 または V_L2 - ポリペプチドリンカー - V_H2 を含む、

V_H2 は、前記 scFvの重鎖可変ドメインを含み、および V_L2 は、前記 scFvの軽鎖可変ドメインを含む、(26)に記載のタンパク質。

(28) BD2と前記 F c 領域との間にタンパク質リンカー L1をさらに含む、(23)～(27)のいずれかに記載のタンパク質。

(29) BD2と前記 F c 領域との間に第1のタンパク質リンカー L1および第2のタンパク質リンカー L2をさらに含む、(23)～(27)のいずれかに記載のタンパク質。

(30) BD2は、リンカー (L1) を介して前記 F c 領域の前記 C_H2 ドメイン、前記 C_H2 ドメイン、または前記 C_H2 および C_H3 ドメインの前記境界面に結合される、(23)～(25)のいずれかに記載のタンパク質。

(31) BD2は、2つのタンパク質リンカー L1および L2を介して前記 F c 領域の前記 C_H2 ドメイン、前記 C_H2 ドメイン、または前記 C_H2 および C_H3 ドメインの前記境界面に結合される、(23)～(25)のいずれかに記載のタンパク質。

(32) L1および L2は、1～25アミノ酸長を有するタンパク質リンカーから独立に

10

20

30

40

50

選択される、(28)～(31)のいずれかに記載のタンパク質。

(33) L1およびL2は、 $(G_4S)_2$ (配列番号41)、 $(G_4S)_3$ (配列番号42)、および $(G_4S)_4$ (配列番号43)から独立に選択される、(28)～(31)のいずれかに記載のタンパク質。

(34) 前記第1および第2のエピトープは異なる、(1)～(33)のいずれかに記載のタンパク質。

(35) 前記第1および第2のエピトープは同じである、(1)～(34)のいずれかに記載のタンパク質。

(36) 配列番号1のアミノ酸配列を含む第1のペプチドおよび配列番号2のアミノ酸配列を含む第2のペプチドを含むPD-1およびCTLA-4に結合する二重特異性結合タンパク質。

10

(37) 配列番号3のアミノ酸配列を含む第1のペプチドおよび配列番号4のアミノ酸配列を含む第2のペプチドを含むPD-1およびCTLA-4に結合する二重特異性結合タンパク質。

(38) 配列番号5のアミノ酸配列を含む第1のペプチドおよび配列番号6のアミノ酸配列を含む第2のペプチドを含むPD-1およびCTLA-4に結合する二重特異性結合タンパク質。

(39) 配列番号9のアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号7のアミノ酸配列を含む第1の軽鎖、配列番号12のアミノ酸配列を含む第2の重鎖、および配列番号4のアミノ酸配列を含む第2の軽鎖を含むPD-1およびCTLA-4に結合する二重特異性結合タンパク質。

20

(40) 配列番号14のアミノ酸配列を含む第1のペプチドおよび配列番号15のアミノ酸配列を含む第2のペプチドを含むPD-L1およびCTLA-4に結合する二重特異性結合タンパク質。

(41) 配列番号16のアミノ酸配列を含む第1のペプチドおよび配列番号17のアミノ酸配列を含む第2のペプチドを含むPD-L1およびCTLA-4に結合する二重特異性結合タンパク質。

(42) 配列番号18のアミノ酸配列を含む第1のペプチドおよび配列番号19のアミノ酸配列を含む第2のペプチドを含むPD-L1およびCTLA-4に結合する二重特異性結合タンパク質。

30

(43) 配列番号22または配列番号89のアミノ酸配列を含む第1のペプチドおよび配列番号23または配列番号90のアミノ酸配列を含む第2のペプチドを含むPD-1およびTIM3に結合する二重特異性結合タンパク質。

(44) 配列番号24または配列番号91のアミノ酸配列を含む第1のペプチドおよび配列番号23または配列番号92のアミノ酸配列を含む第2のペプチドを含むPD-1およびTIM3に結合する二重特異性結合タンパク質。

(45) 配列番号9のアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号7のアミノ酸配列を含む第1の軽鎖、配列番号27または配列番号30のアミノ酸配列を含む第2の重鎖、および配列番号26または配列番号28のアミノ酸配列を含む第2の軽鎖を含むPD-1およびTIM3に結合する二重特異性結合タンパク質。

40

(46) 配列番号34のアミノ酸配列を含む第1のペプチドおよび配列番号32のアミノ酸配列を含む第2のペプチドを含むOX40およびPD-L1に結合する二重特異性結合タンパク質。

(47) 配列番号35のアミノ酸配列を含む第1のペプチドおよび配列番号32のアミノ酸配列を含む第2のペプチドを含むOX40およびPD-L1に結合する二重特異性結合タンパク質。

(48) 配列番号36または配列番号94のアミノ酸配列を含む第1のペプチドおよび配列番号32または配列番号93のアミノ酸配列を含む第2のペプチドを含むOX40およびPD-L1に結合する二重特異性結合タンパク質。

(49) CDR1、CDR2およびCDR3を含む重鎖ならびにCDR1、CDR2およ

50

びC D R 3を含む軽鎖を含むT I M 3に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントであって、前記重鎖C D R 1は、配列番号79を含み、前記重鎖C D R 2は、配列番号80を含み、前記重鎖C D R 3は、配列番号81を含み、および前記軽鎖C D R 1は、配列番号82を含み、前記軽鎖C D R 2は、配列番号83を含み、前記軽鎖C D R 3は、配列番号84を含む、抗体またはその抗原結合フラグメント。

(50) 重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域は、配列番号85を含み、および前記軽鎖可変領域は、配列番号86を含む、(49)に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

(51) 前記重鎖は、配列番号87を含み、および前記軽鎖は、配列番号88を含む、(49)に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

(52) (1)～(51)のいずれかに記載のタンパク質または抗体と、薬学的に許容されるキャリアとを含む組成物。

(53) (1)～(51)のいずれかに記載のタンパク質または抗体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子。

(54) (53)に記載の核酸分子を含むベクター。

(55) (54)に記載のベクターを含む宿主細胞。

(56) 対象において癌を治療または予防する方法であって、(1)～(51)のいずれかに記載のタンパク質または抗体を前記対象に投与するステップを含む方法。

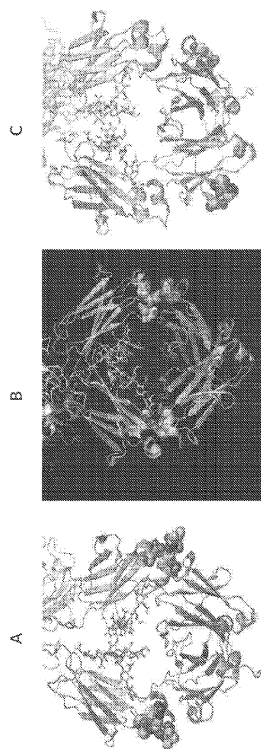
(57) 前記癌は、卵巣癌、乳癌、大腸癌、前立腺癌、子宮頸癌、子宮癌、精巣癌、膀胱癌、頭部および頸部癌、黒色腫、膵臓癌、腎細胞癌、ならびに肺癌の1つまたは複数である、(56)に記載の方法。

(58) 対象において免疫応答を増強する方法であって、(1)～(51)のいずれかに記載のタンパク質または抗体を前記対象に投与するステップを含む方法。

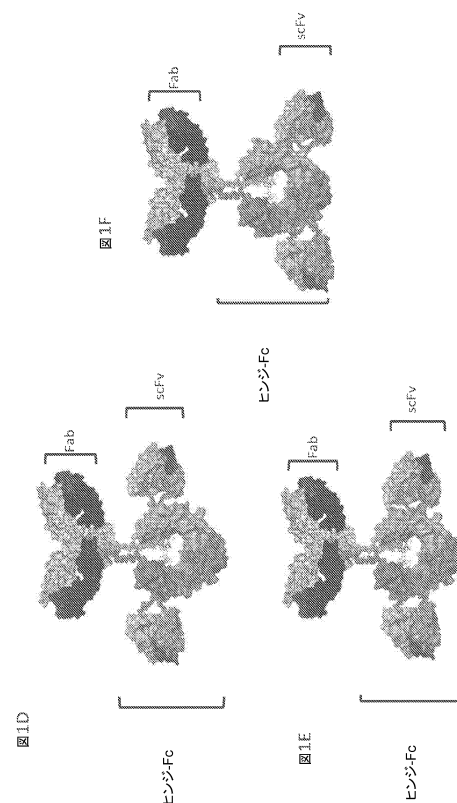
10

20

【図1-1】



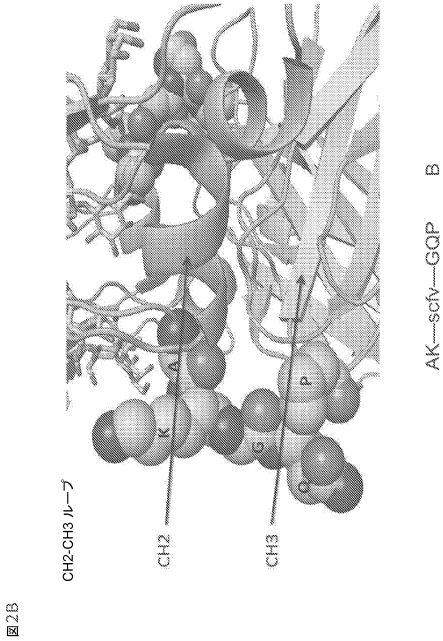
【図1-2】



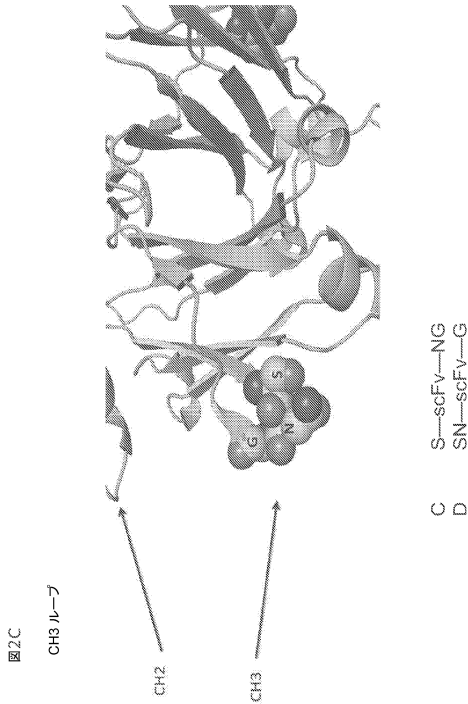
【図 2 - 1】



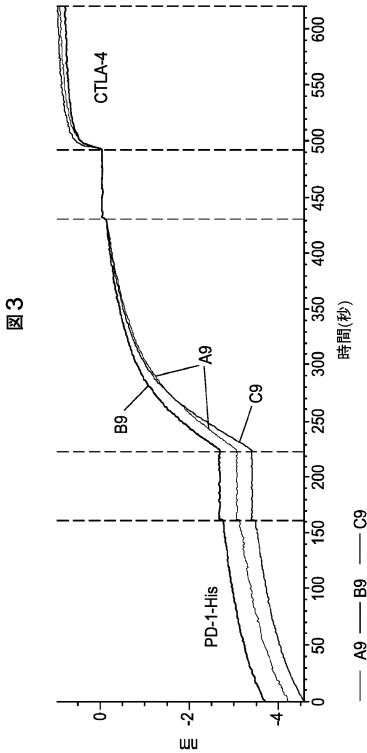
【図 2 - 2】



【図 2 - 3】



【図 3】



【図 4】

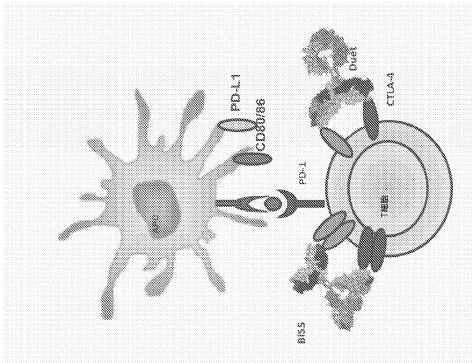
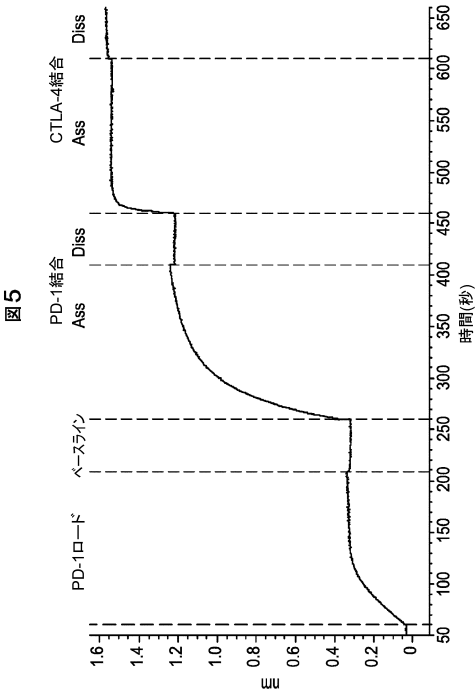


図 4

【図 5】



【図 6 - 1】

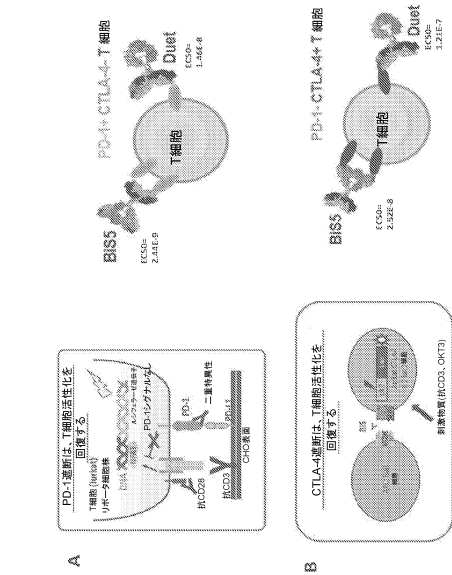


図 6

【図 6 - 2】

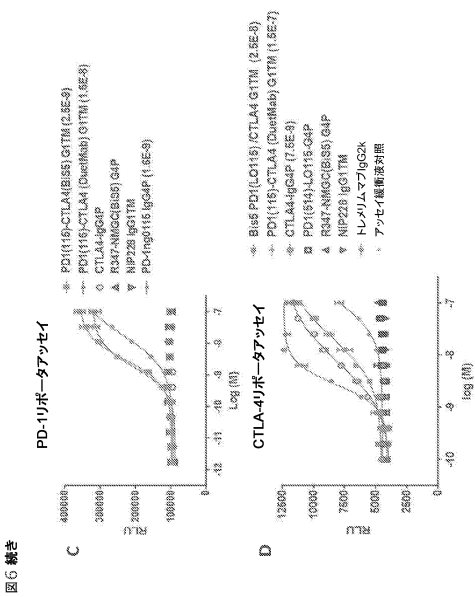
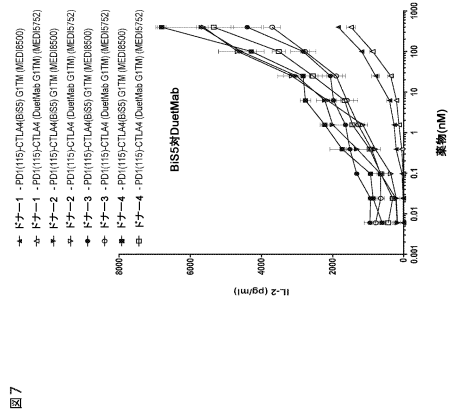
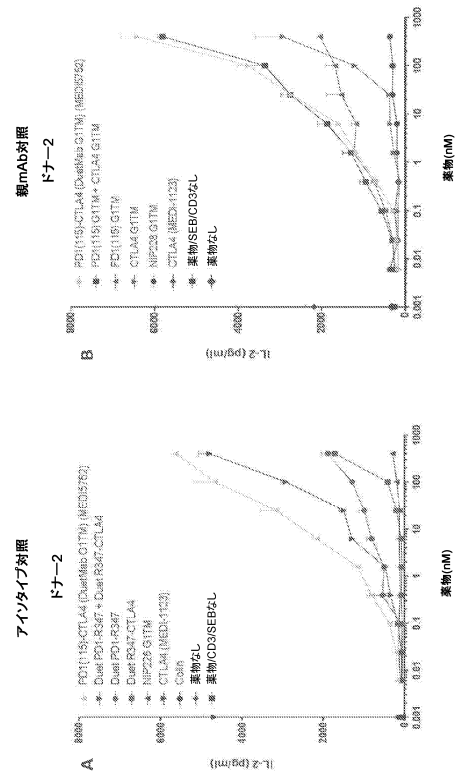


図 5 続き

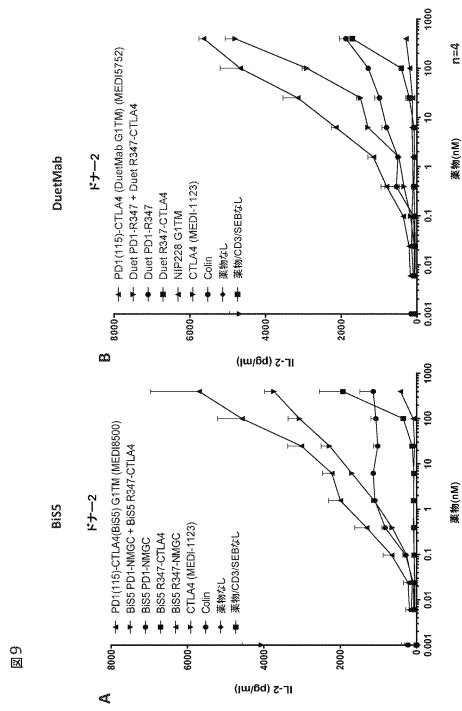
【圖 7】



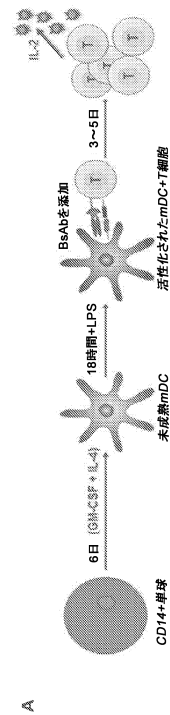
【图 8】



【図 9】

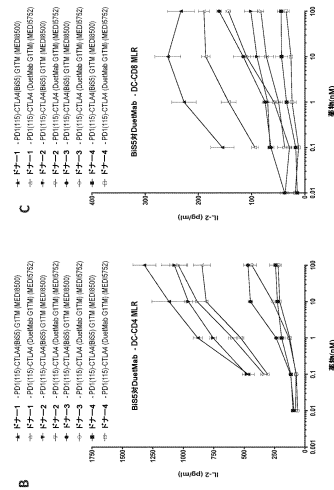


【図 10-1】



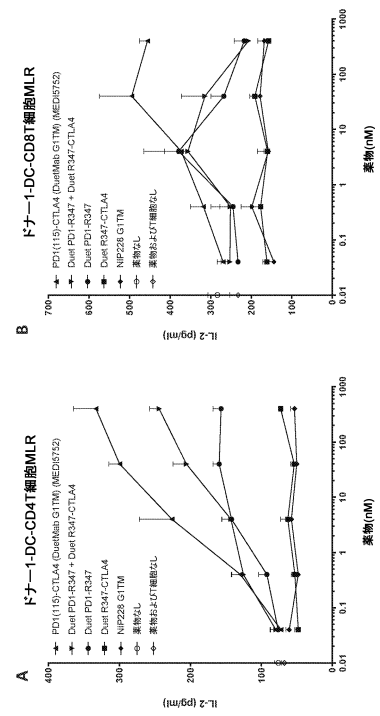
【図 10 - 2】

図 10 続き



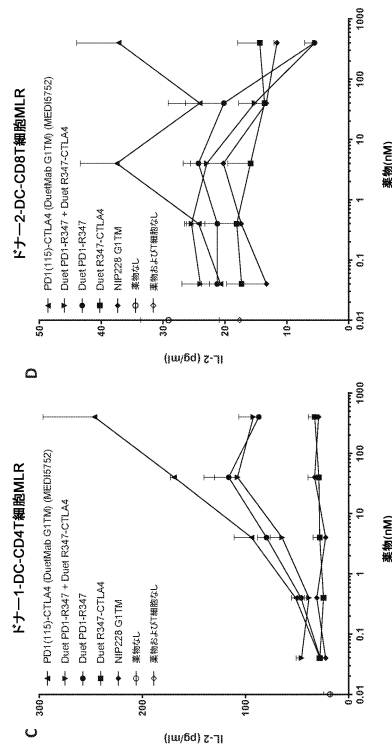
【図 11 - 1】

図 11



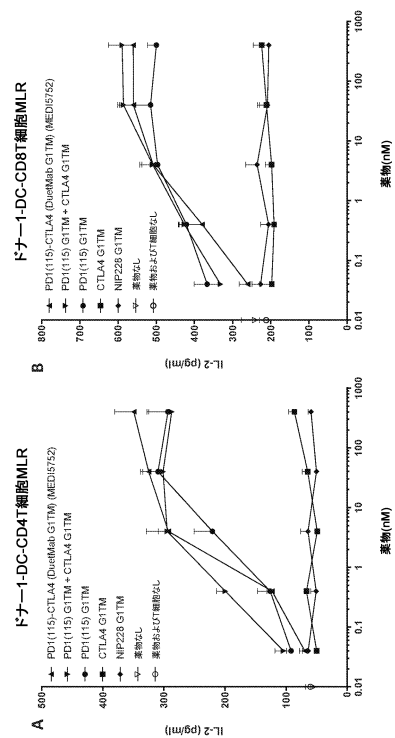
【図 11 - 2】

図 11 続き

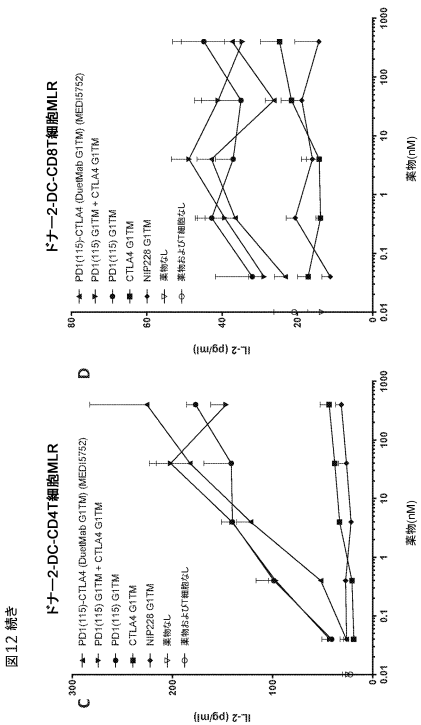


【図 12 - 1】

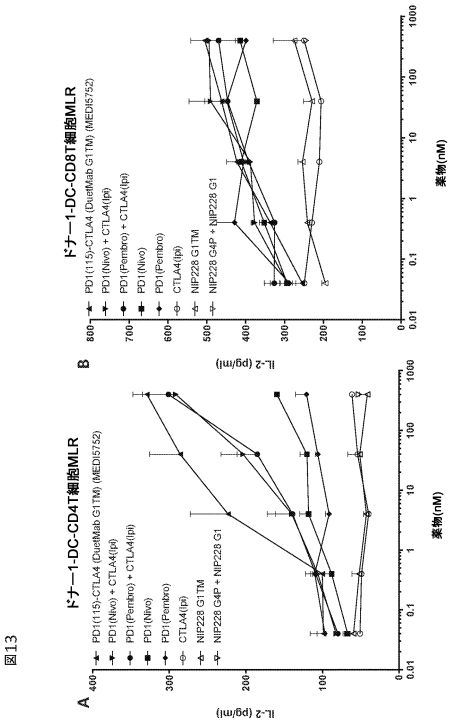
図 12



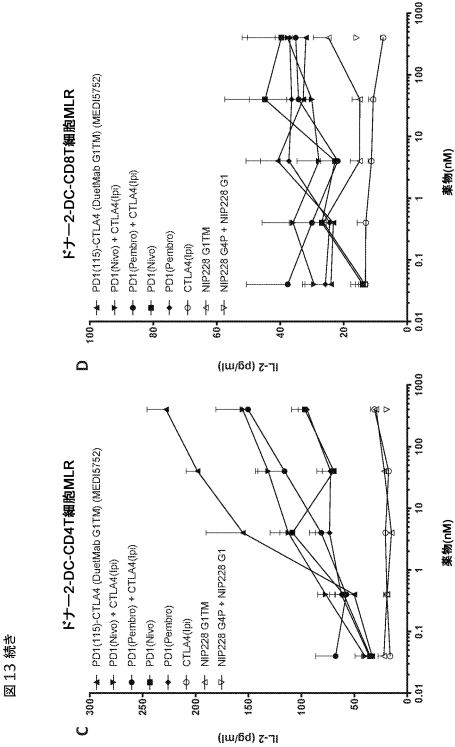
【図 1 2 - 2】



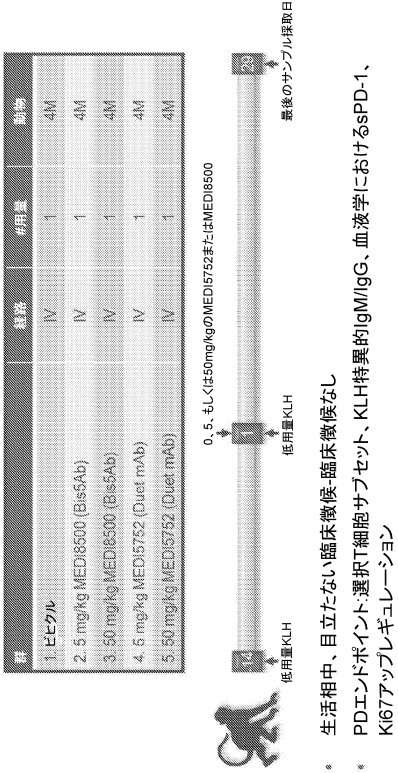
【図 1 3 - 1】



【図 1 3 - 2】



【図 1 4】



【図 15】

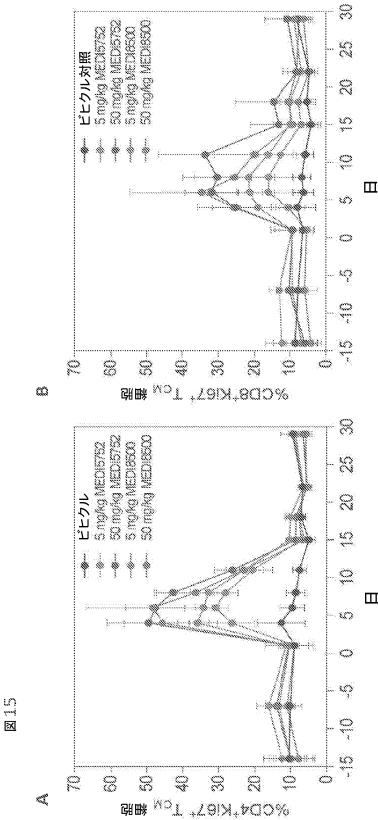


図 15

【図 17】

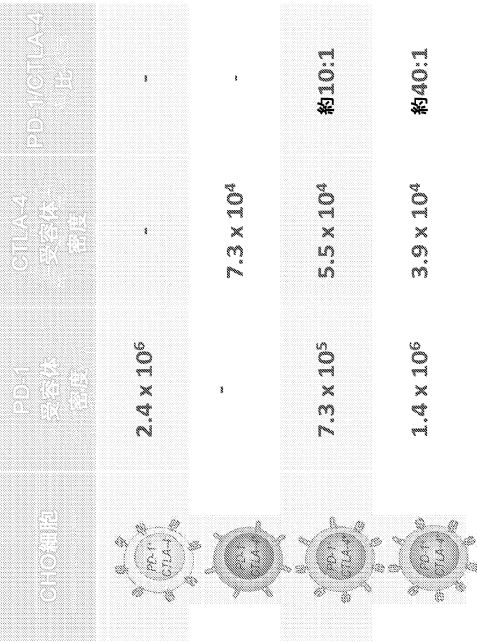


図 17

【図 16】

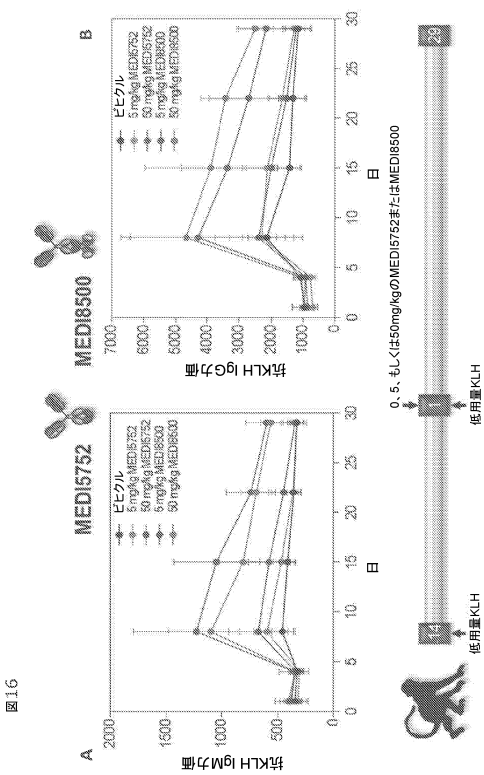


図 16

【図 18】

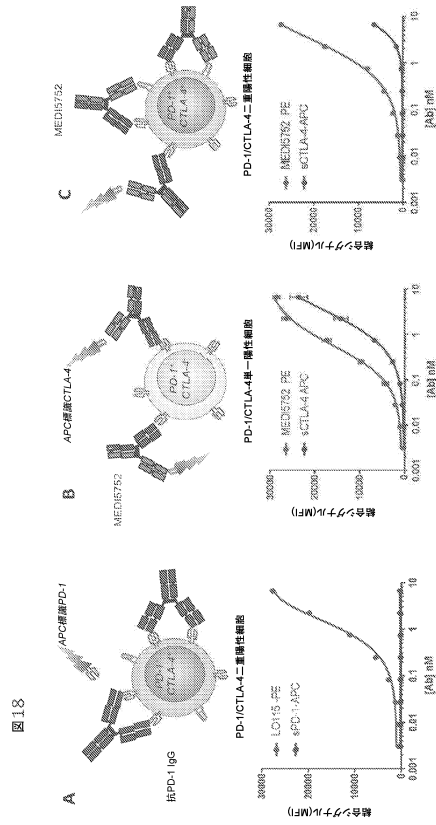


図 18

【図 19】

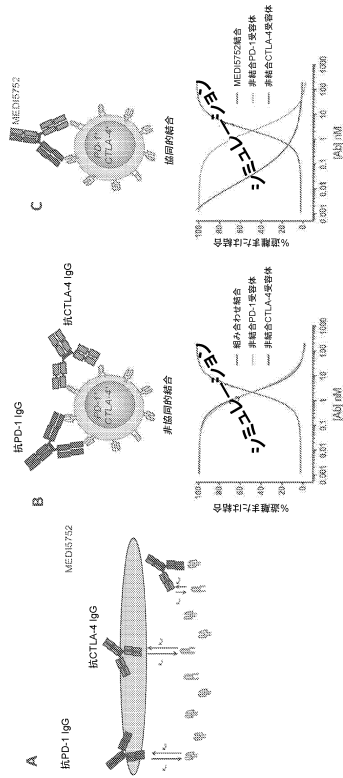


図 19

【図 20】

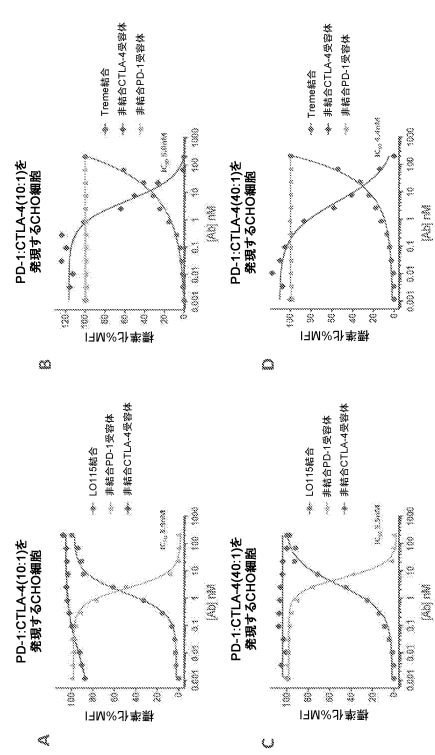


図 20

【図 21】

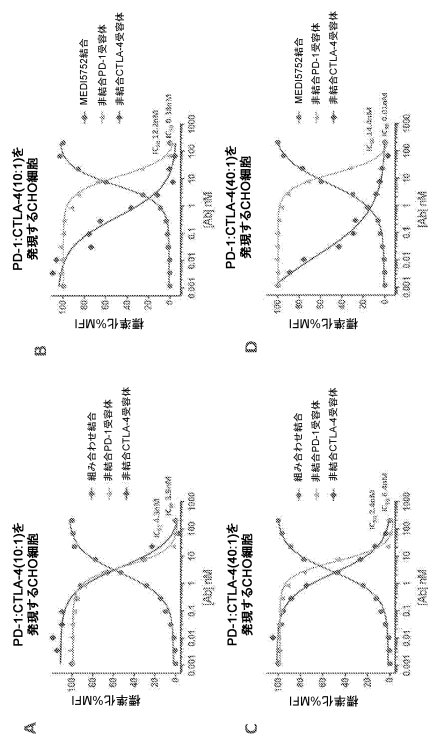


図 21

【図 22】

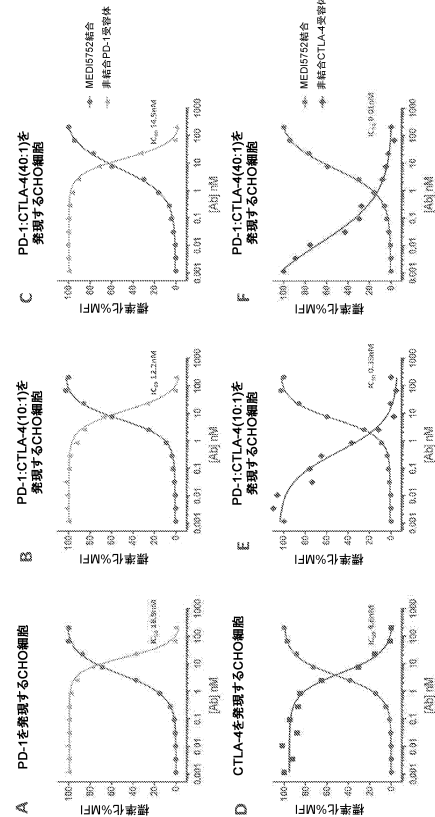
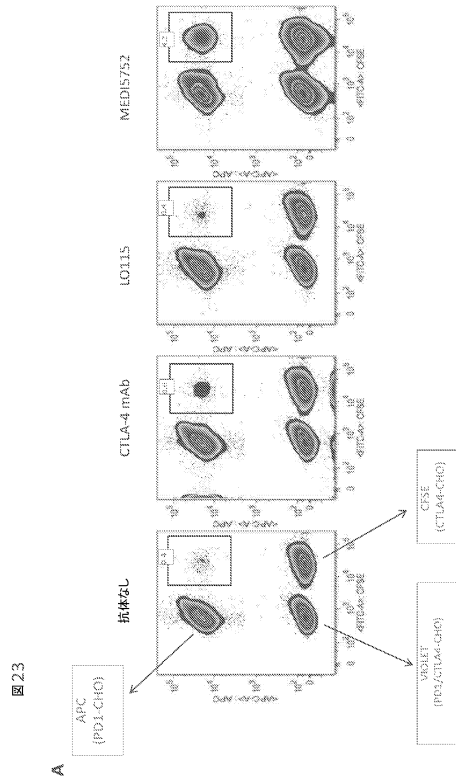


図 22

【图 2 3-1】



【图 2 3-2】

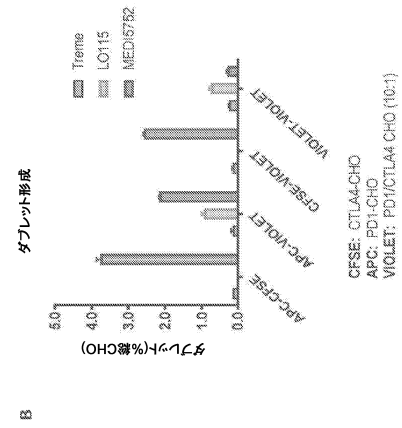
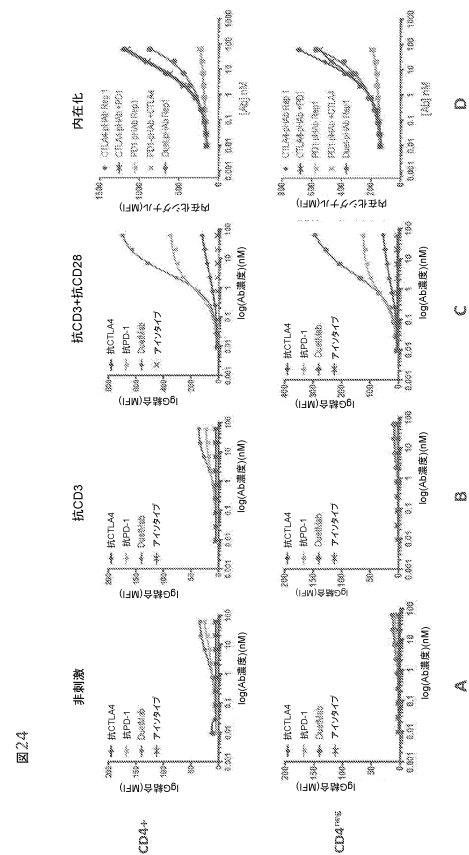
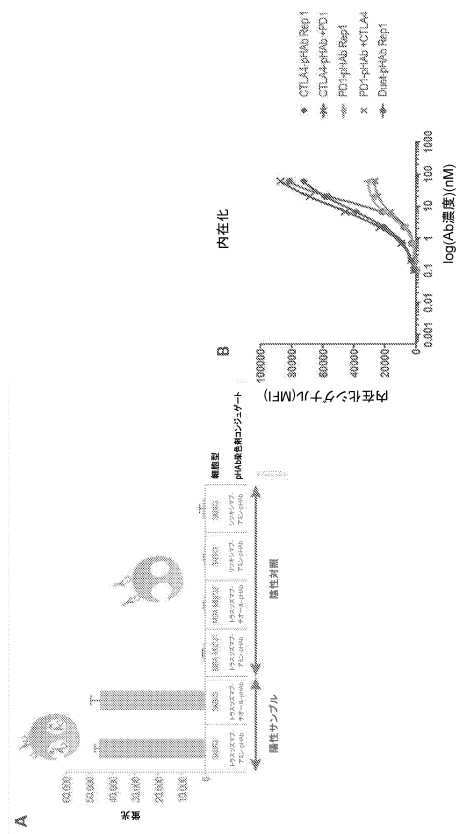


図23 続き

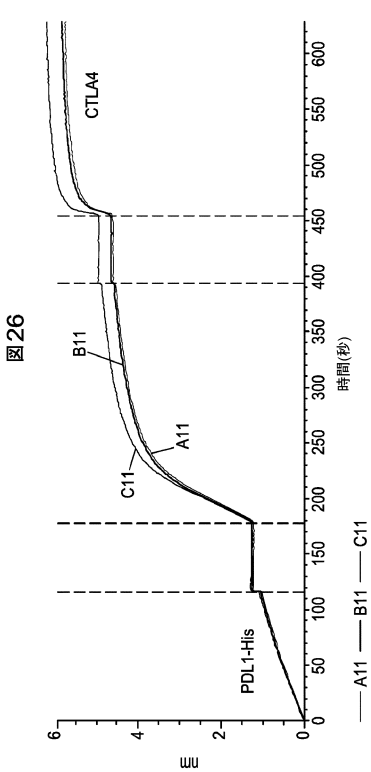
【図 2 4】



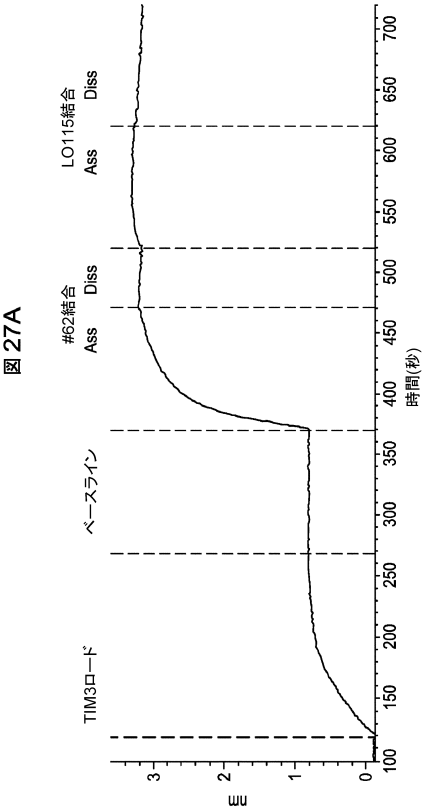
【図 2 5】



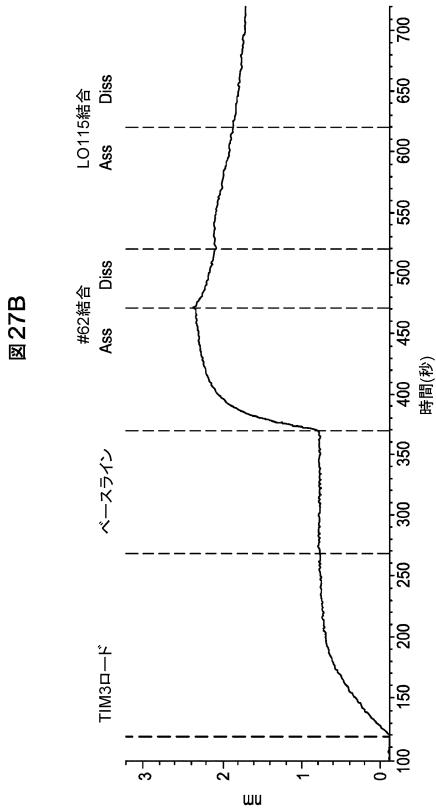
【図 2 6】



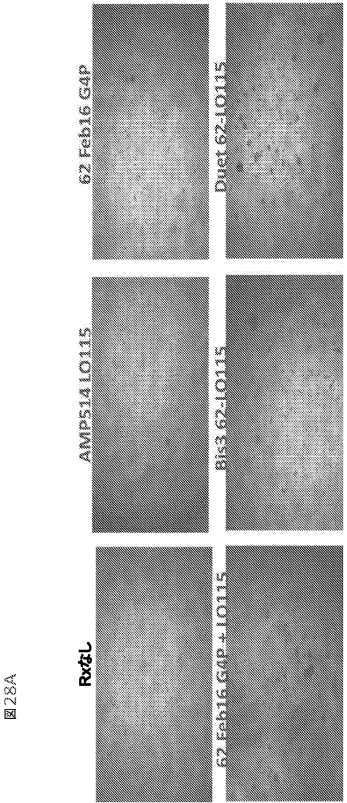
【図 2 7 A】



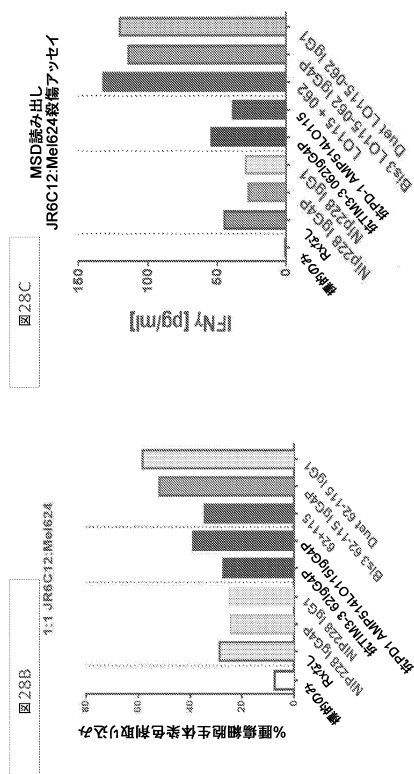
【図 2 7 B】



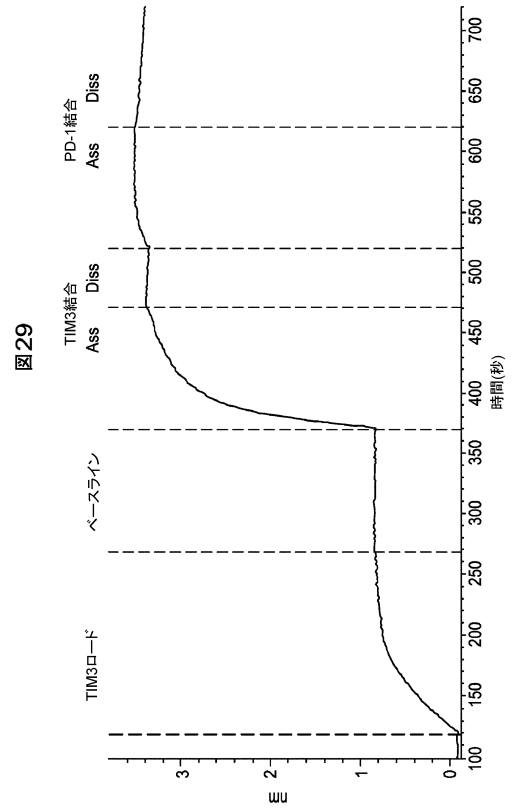
【図 2 8 - 1】



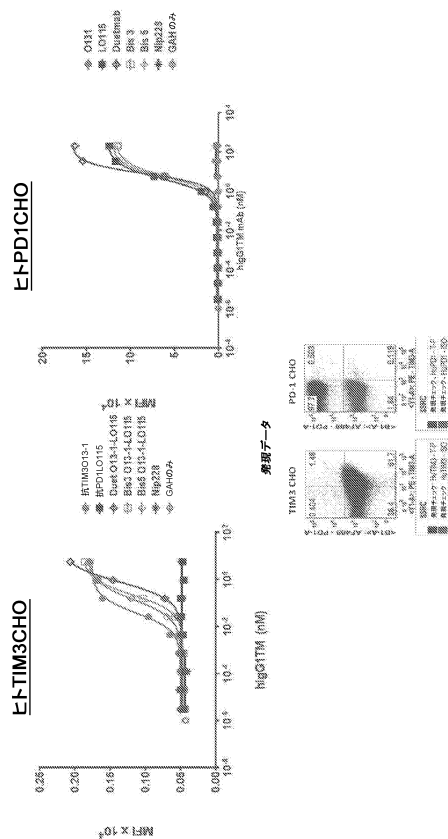
【図 28-2】



【図 29】



【図 30】



【図 31】

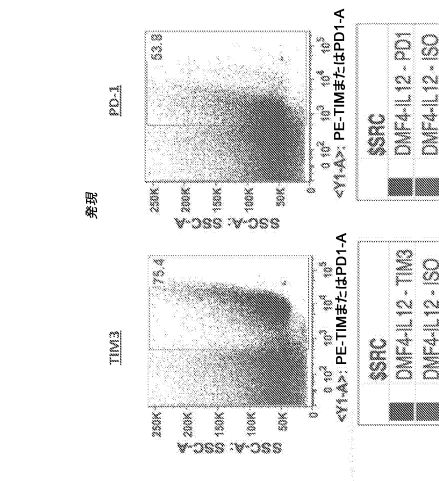
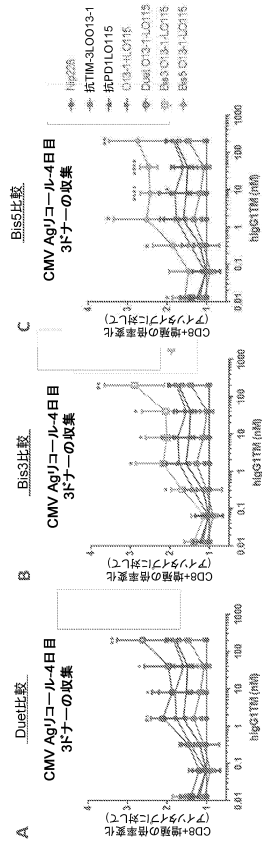


図 31

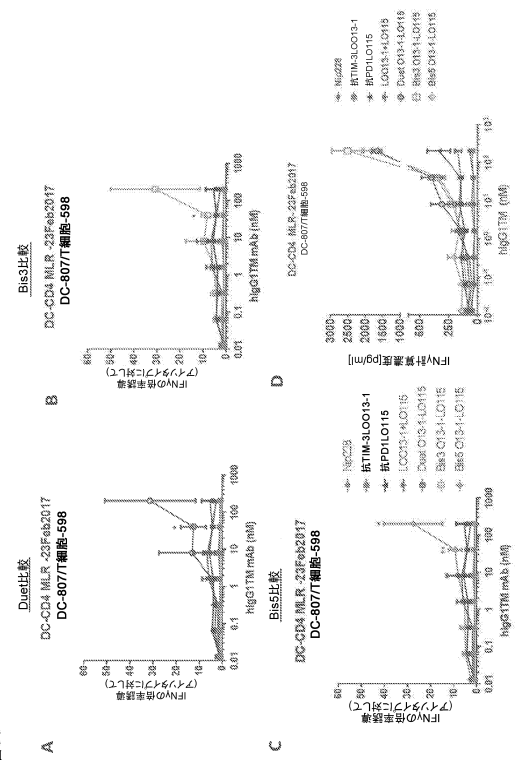
【図 3 2】

図 32



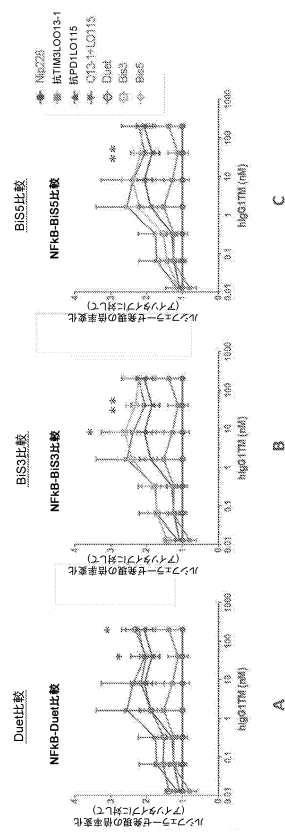
【図 3 3】

図 33



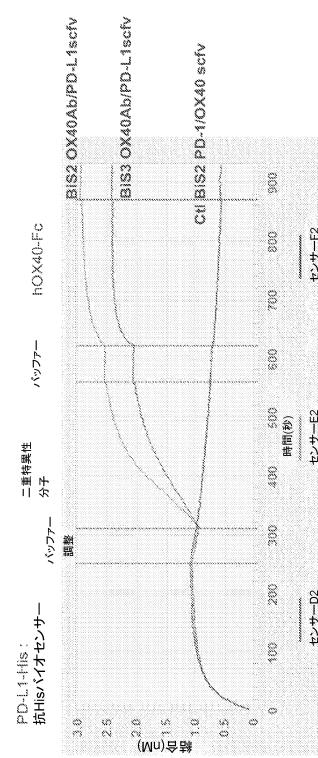
【図 3 4】

図 34



【図 3 5】

図 35



【図 3 6 - 1】

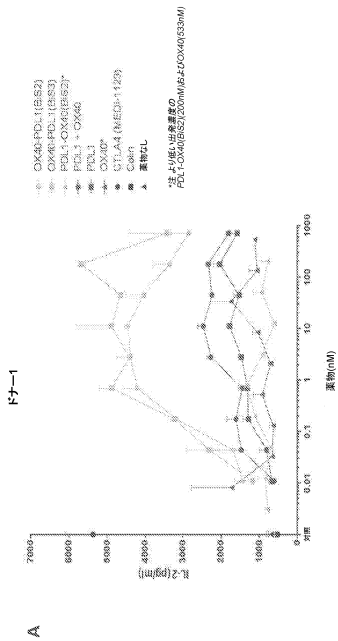


図 36

【図 3 6 - 2】

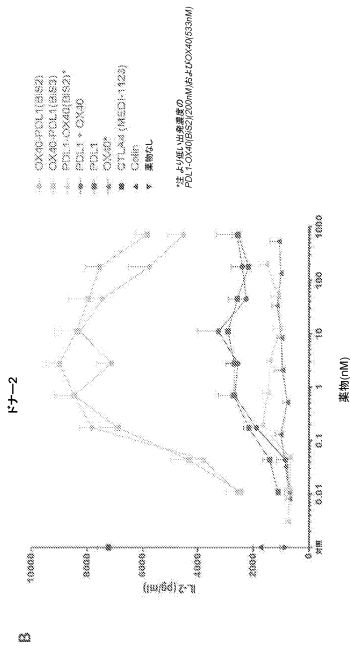


図 36 続き

【図 3 7】

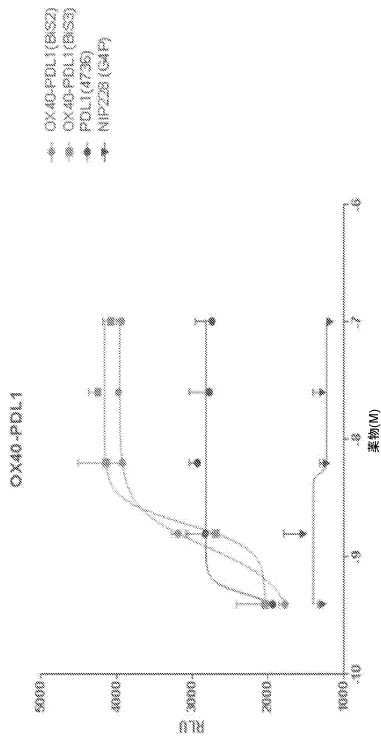


図 37

【図 3 8】

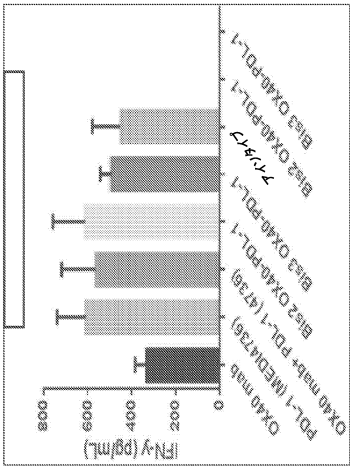
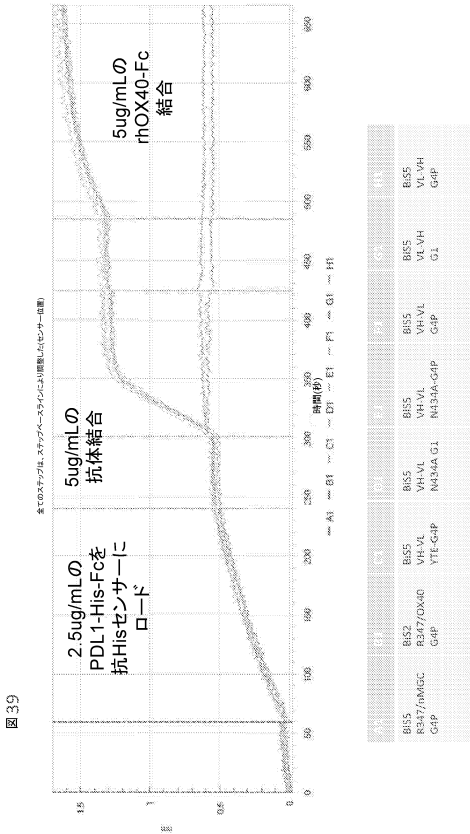
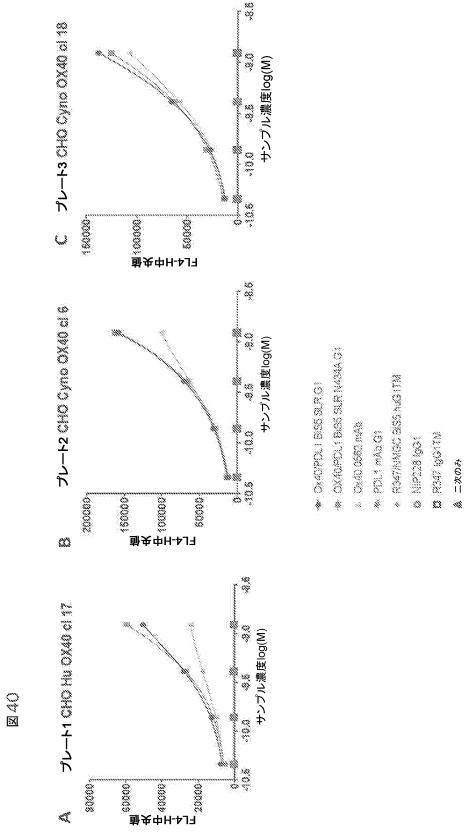


図 38

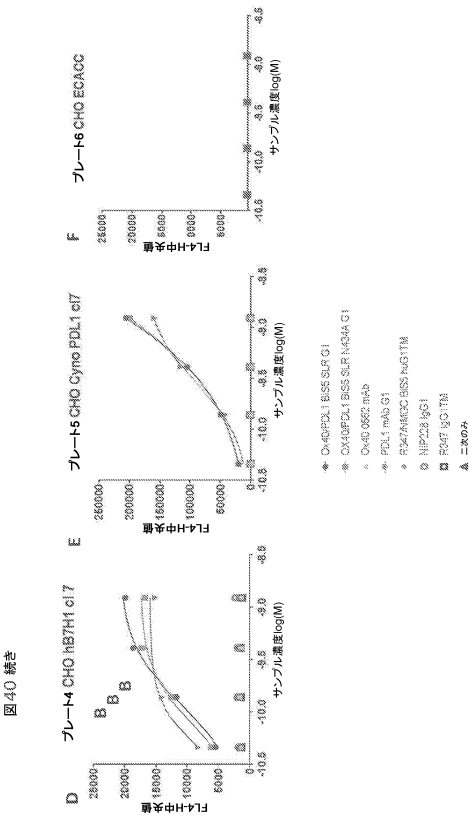
【図 3 9】



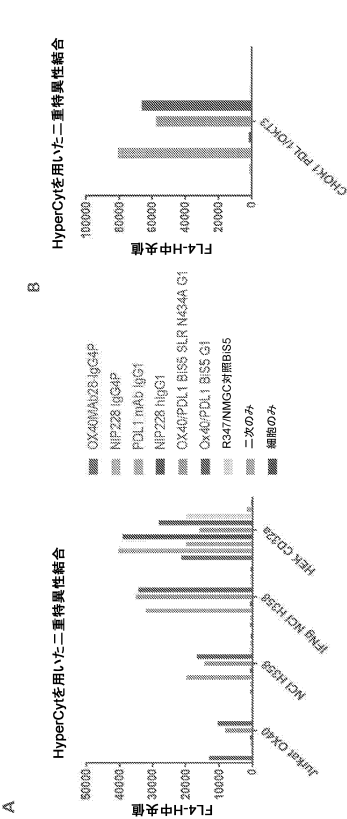
【図 4 0 - 1】



【図 4 0 - 2】

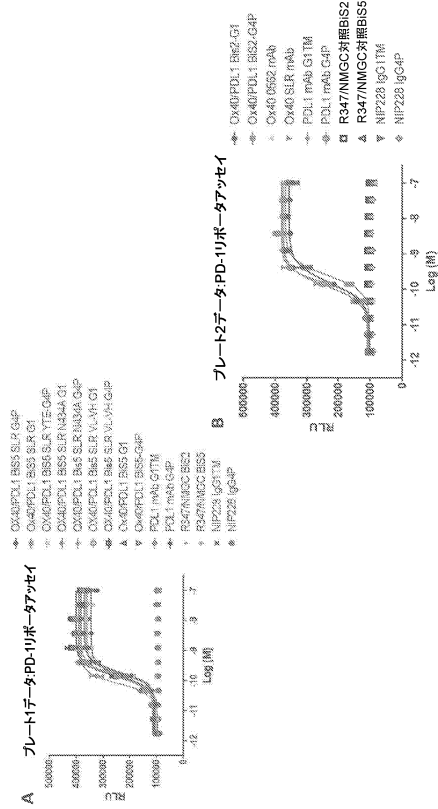


【図 4 1】



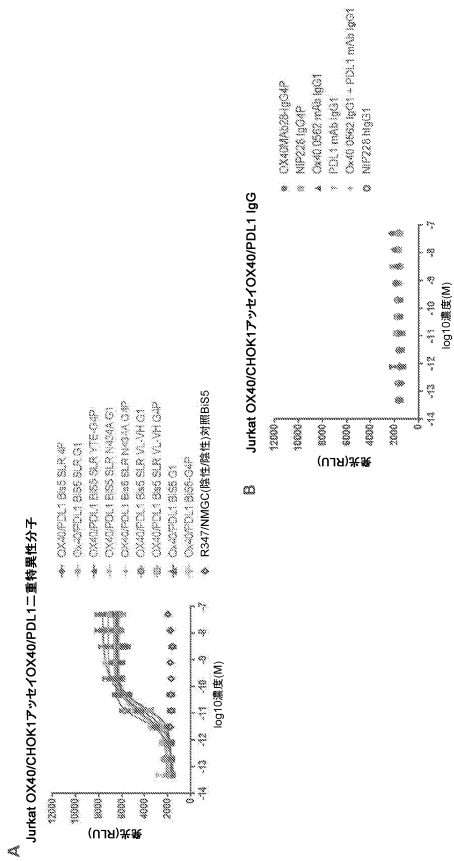
【図 4 2】

図 4.2



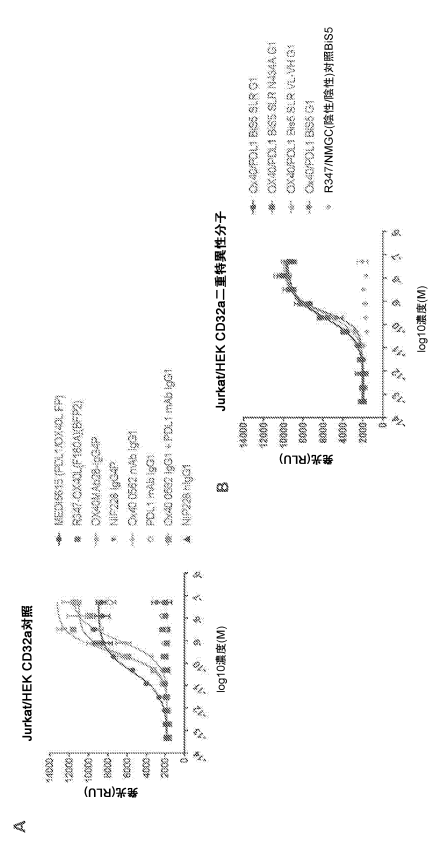
【図 4 4】

図 4.4



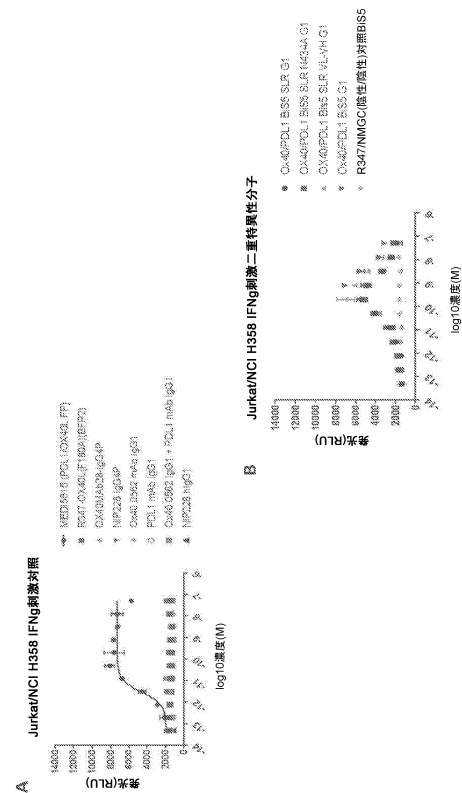
【図 4 3】

図 4.3



【図 4 5】

図 4.5



【図 48-2】

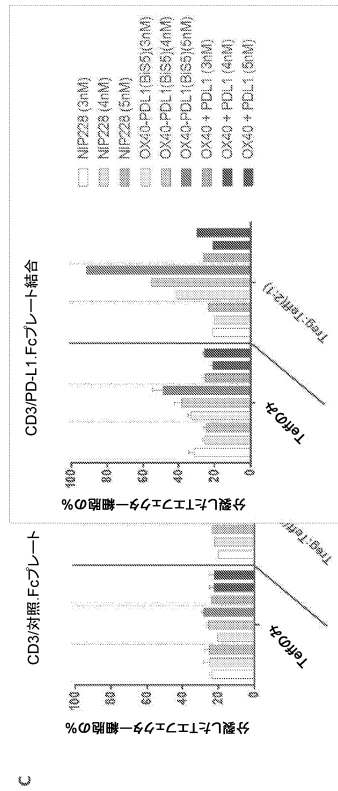


図 48 続き

C

【図 49】

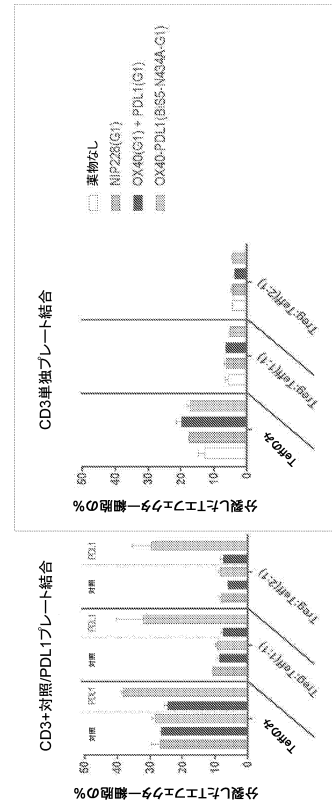


図 49

【図 50】

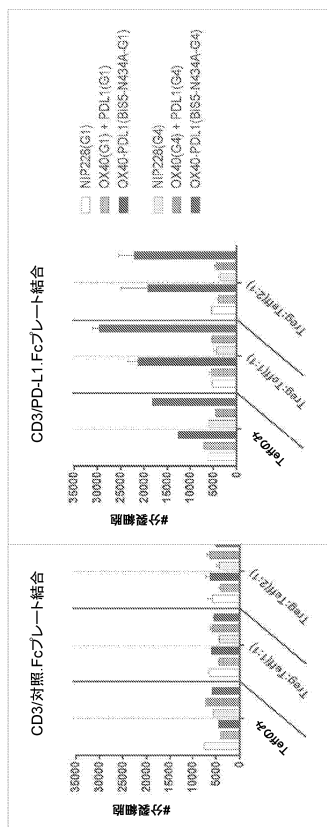


図 50

【図 51】

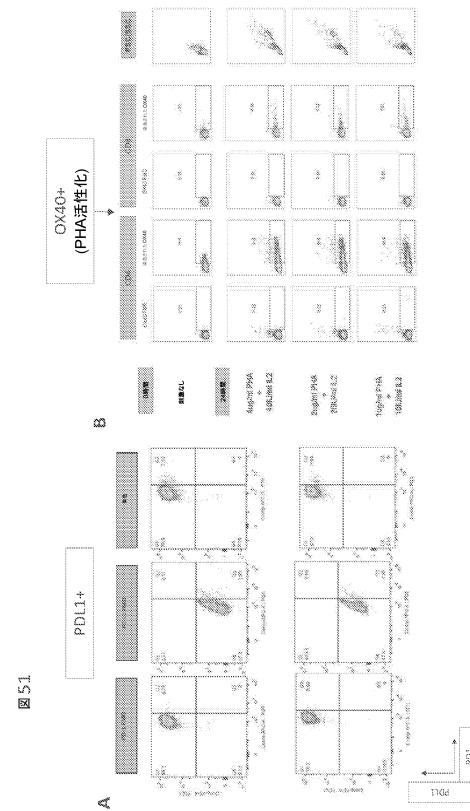
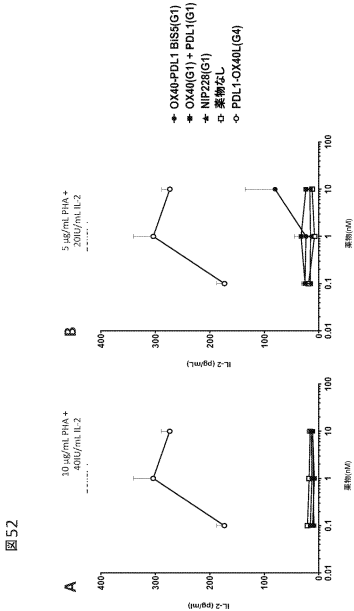
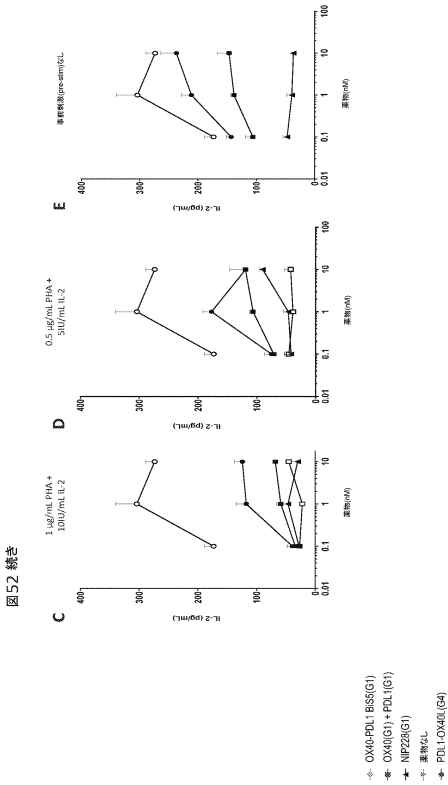


図 51

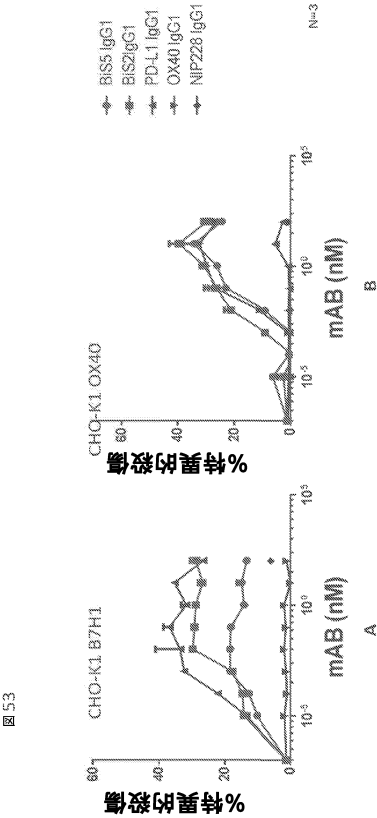
【図 5 2 - 1】



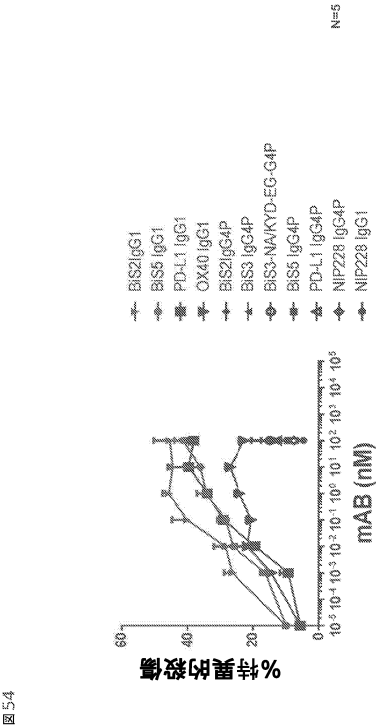
【図 5 2 - 2】



【図 5 3】

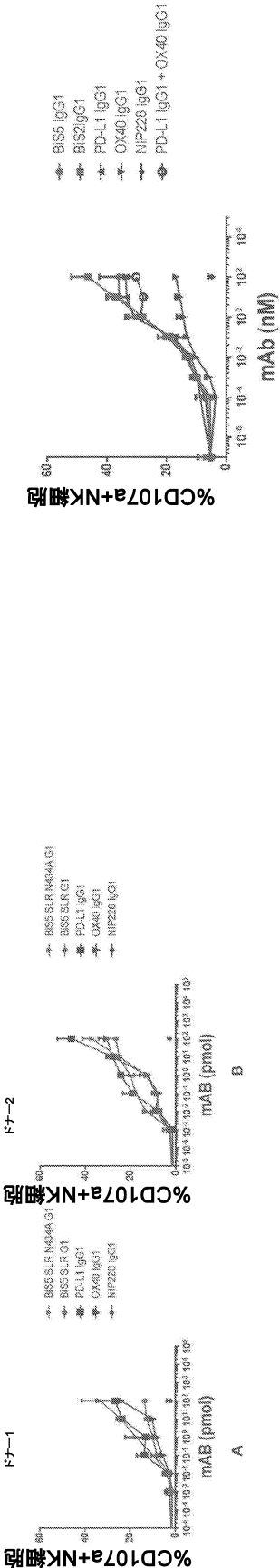


【図 5 4】



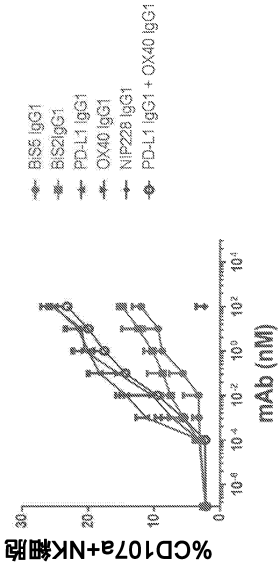
【図 5 5】

図 55



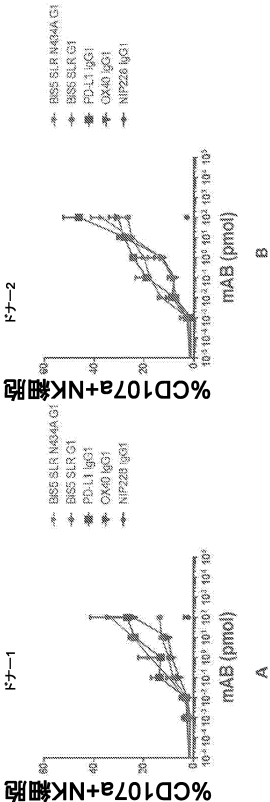
【図 5 6】

図 56



【図 5 7】

図 57



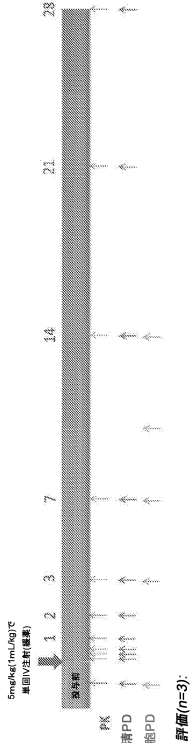
【図 5 8】

試験設計

図 58

目的: OX40/PD-L1 BISAのPK/PDを比較すること:

- BISS-OX40/PD-L1 G1 N454A (半減期延長突然変異を含む)
- 5mg/kg (1mL/kg)での単回IV注射(濃縮液+ボラス)

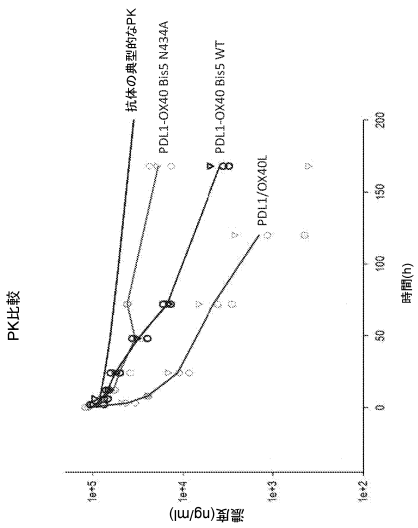


評価(n=3):

- 生存率、臨床観察、身体検査、注射部位、体重、摂食量
 - PK: 投与前、投与から2、6、12、24、48、72および168時間後、14日、21日、28日目
 - ADA
 - 血清PD: 可溶性PD-L1 (PKサンプルを2回反復)
 - 細胞PD: 流量に基づくKi67染色の評価
- 実行:
- 注射からPK要約までの50日

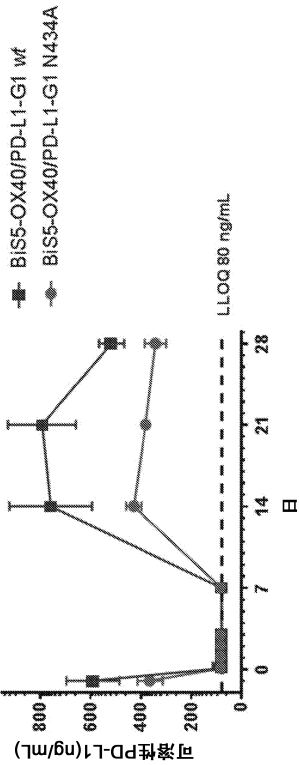
【図 5 9】

図 59



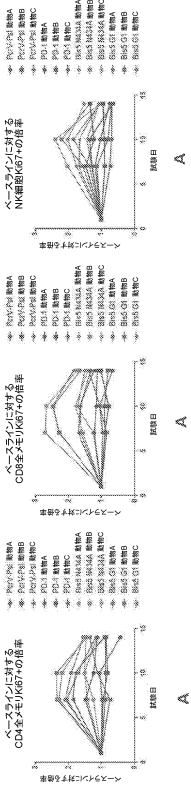
【図 6 0】

図 60



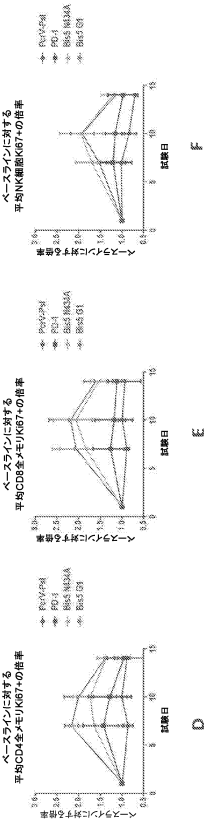
【図 6 1 - 1】

図 61

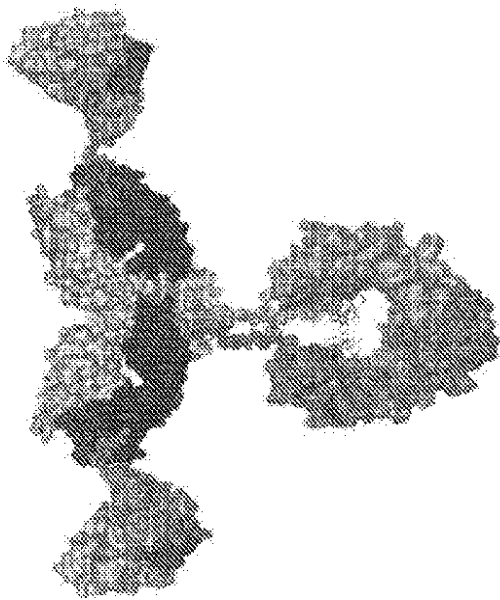


【図 6 1 - 2】

図 61 続き

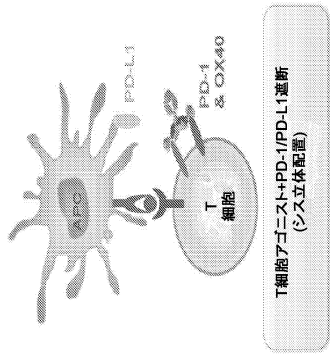


【図 6 2】



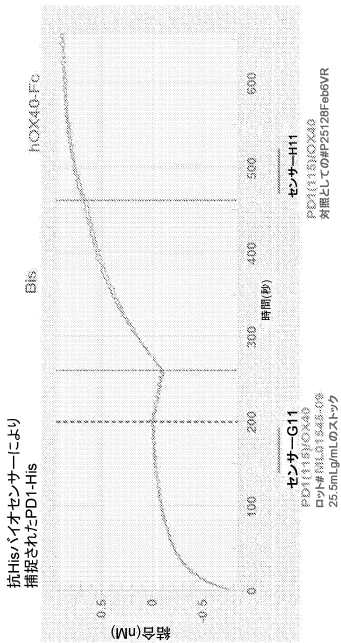
【図 6 3】

図 63



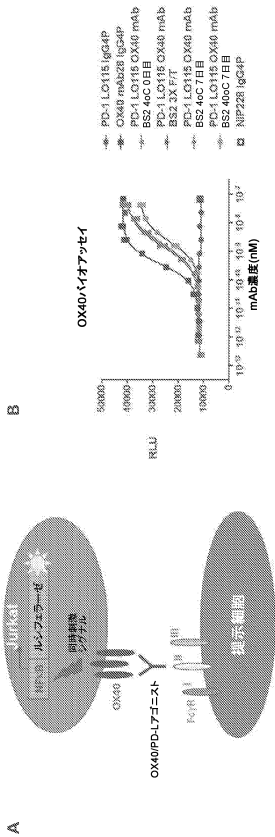
【図 6 4】

図 64



【図 6 5】

図 65



【図 6 6】

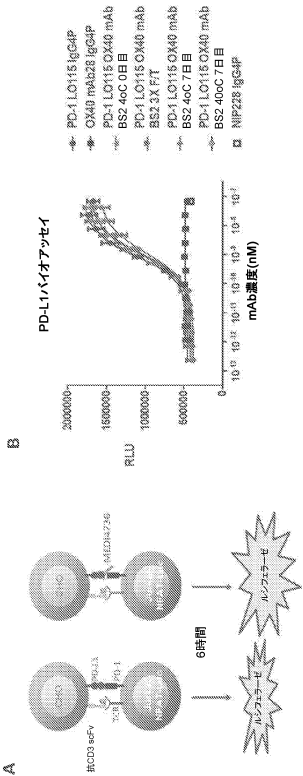


図 66

【図 6 8】

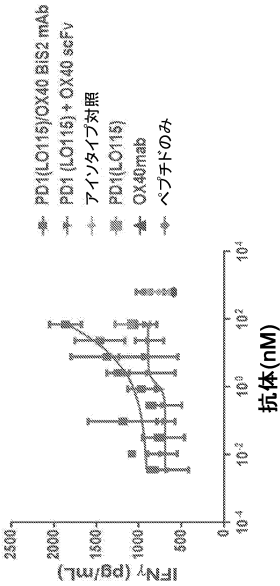


図 68

【図 6 7】

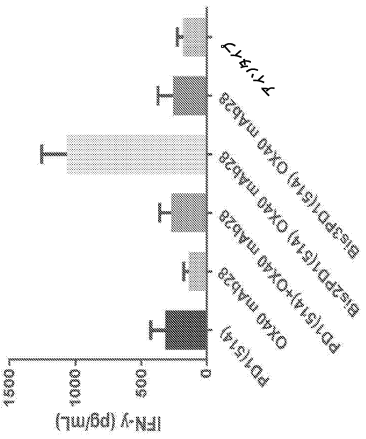


図 67

【図 6 9】

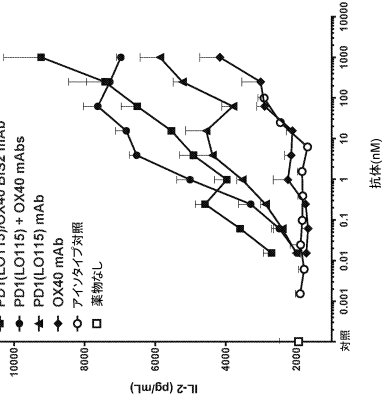
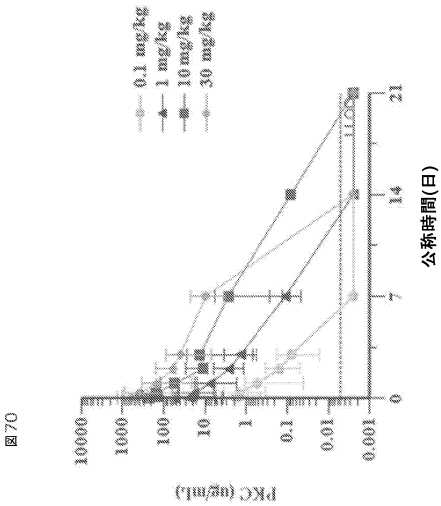
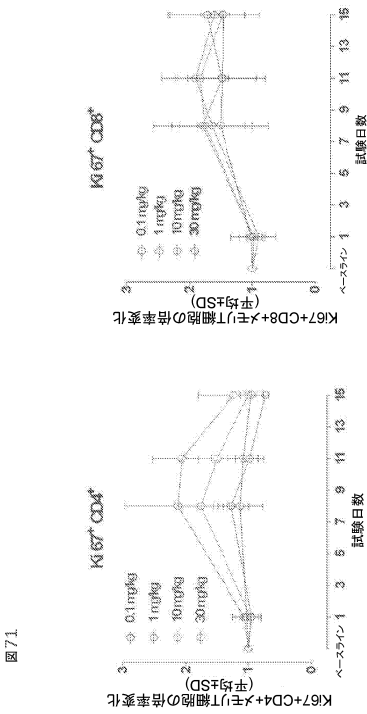


図 69

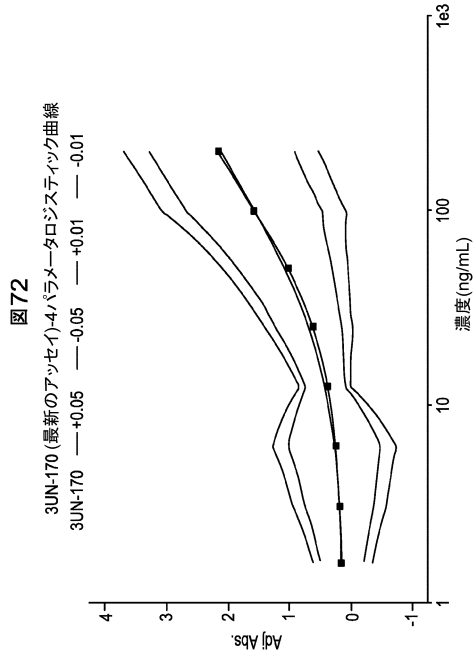
【図 7 0】



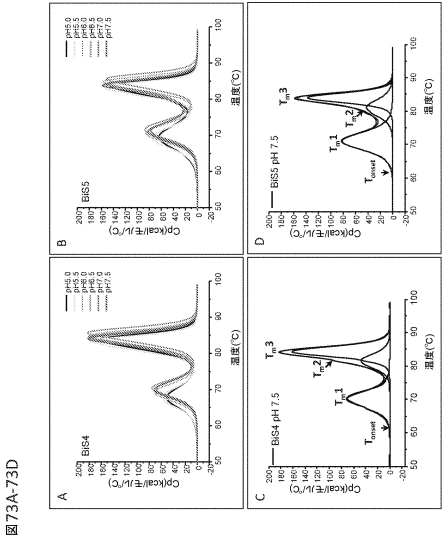
【図 7 1】



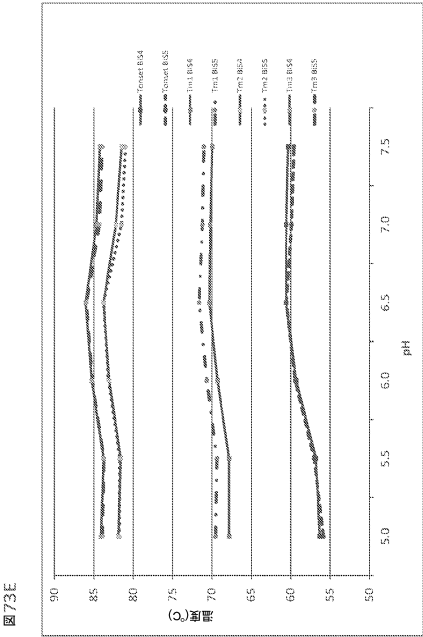
【図 7 2】



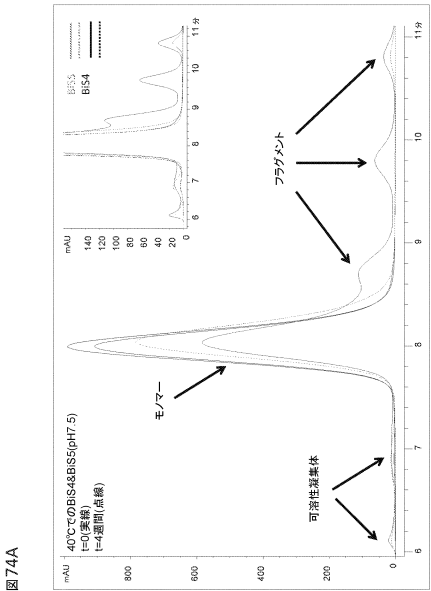
【図 7 3 - 1】



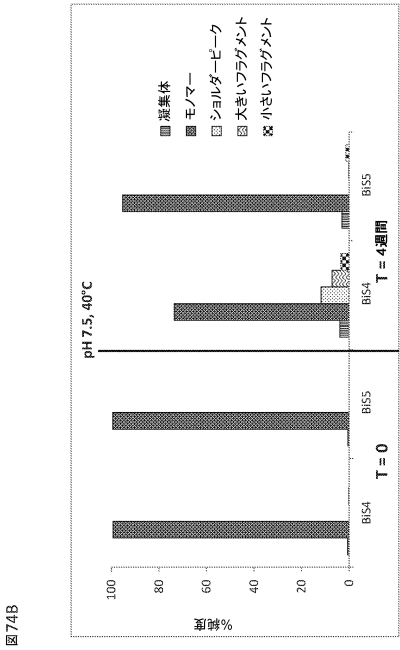
【図 7 3－2】



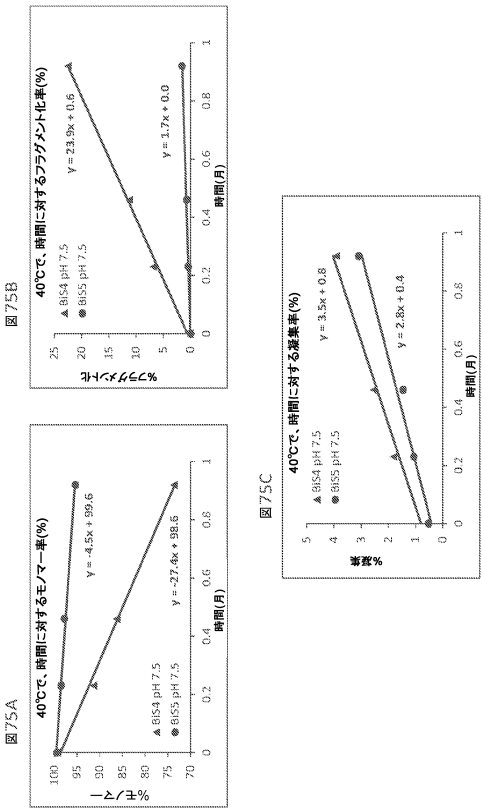
【図 7 4－1】



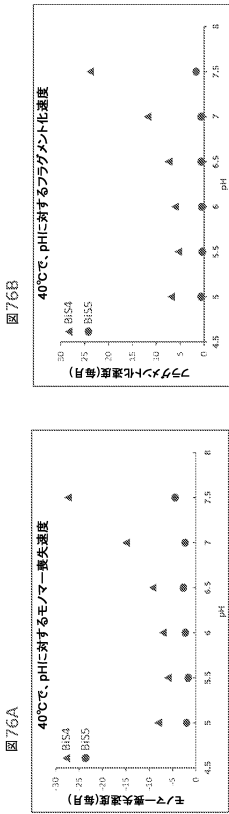
【図 7 4－2】



【図 7 5】

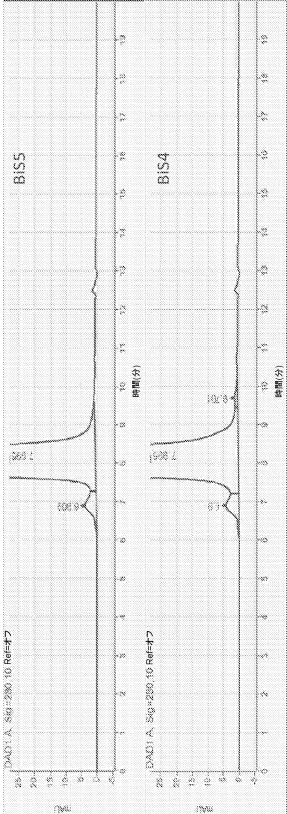


【図 76】

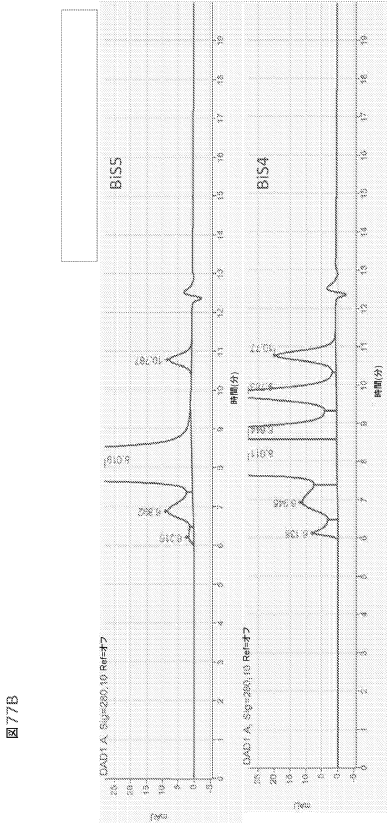


【図 77-1】

図 77A

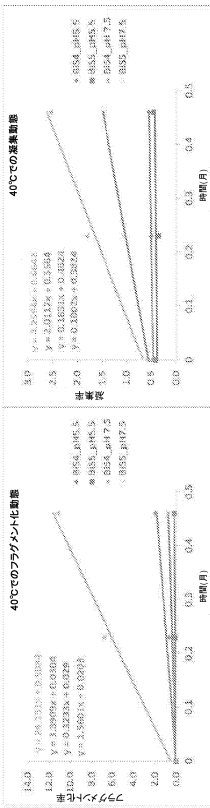


【図 77-2】



【図 78】

図 78



【図 7 9】

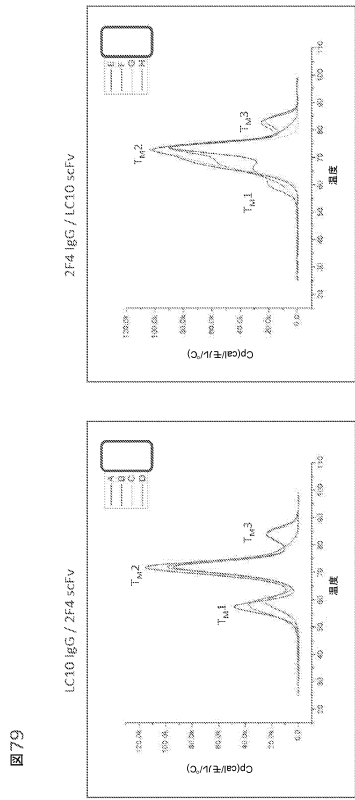
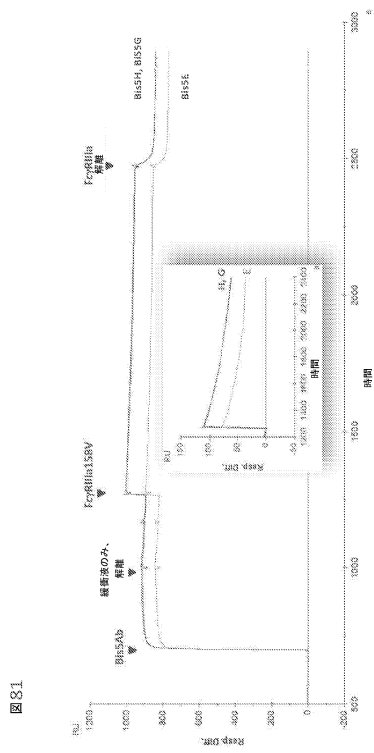


図 79

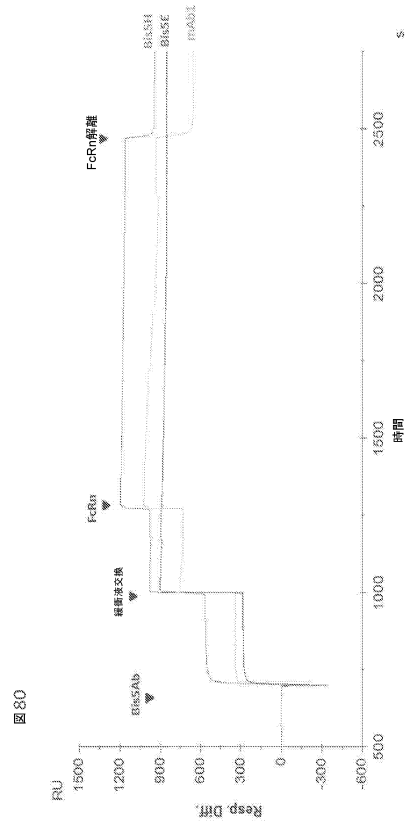
【図 8 1】



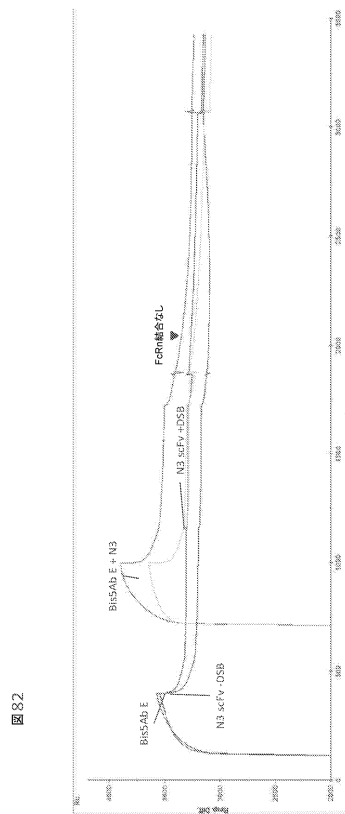
(124)

JP 6952716 B2 2021.10.20

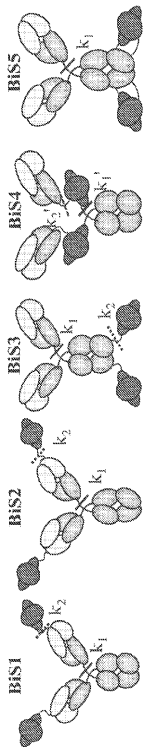
【図 8 0】



【図 8 2】



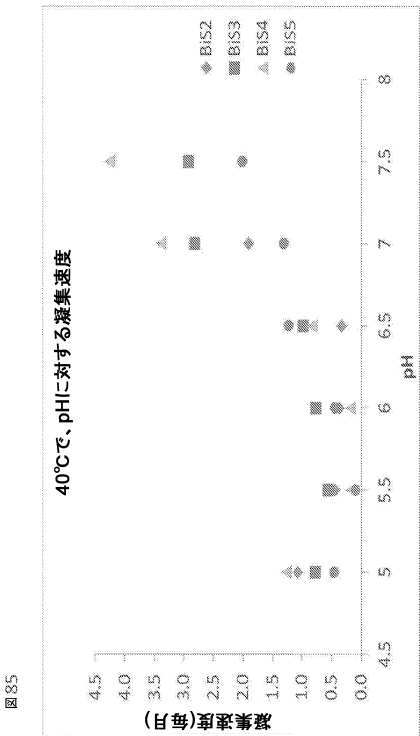
【図 8 3】



【図 8 4】



【図 8 5】



【図 8 6】



【図 8 7】

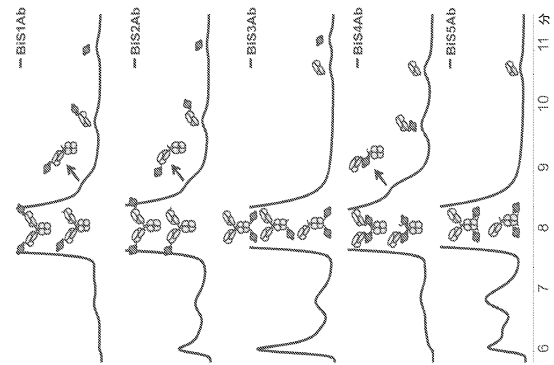


図 87

【図 8 8】

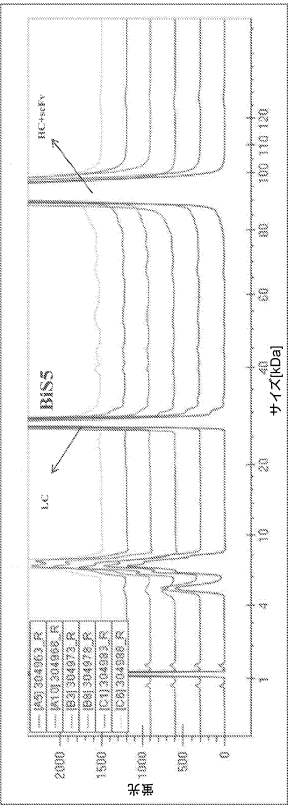


図 88

【図 8 9】

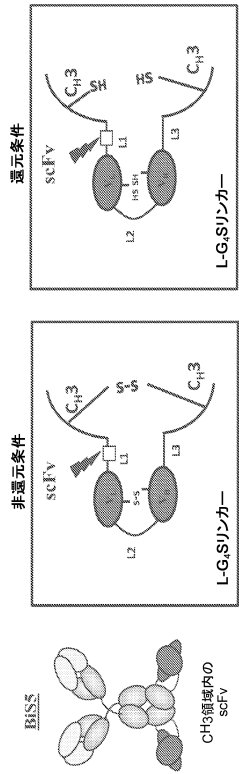


図 89

【図 9 0】

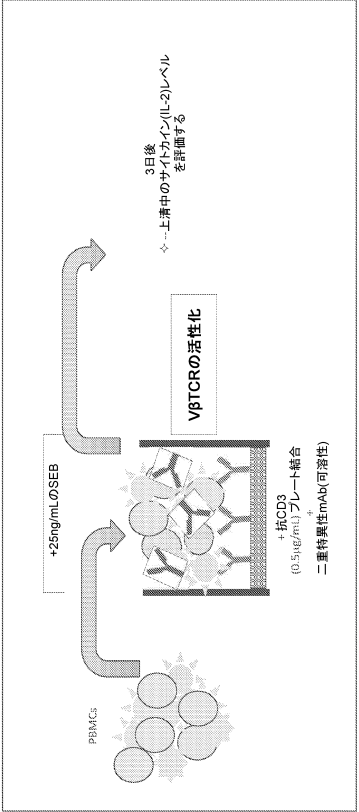


図 90

【配列表】

0006952716000001.app

フロントページの続き

- | | |
|--------------------------|------------------|
| (51)Int.Cl. | F I |
| C 1 2 N 1/21 (2006.01) | C 1 2 N 1/21 |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01) | C 1 2 N 5/10 |
| A 6 1 K 39/395 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 N |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01) | A 6 1 P 35/00 |
- (72)発明者 ガオ, チャンスー
アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイサースバーグ, ワン メディミューン ウェイ, メディミューン, エルエルシー
- (72)発明者 レイニー, ゴドフリー
アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイサースバーグ, ワン メディミューン ウェイ, メディミューン, エルエルシー
- (72)発明者 モロウ, ミシェル
イギリス国 シービー21 6ジーエイチ ケンブリッジ, グランタ パーク, ミルステイン ビルディング, メディミューン, リミテッド
- (72)発明者 ドブソン, クレア, ルイーズ
イギリス国 シービー21 6ジーエイチ ケンブリッジ, グランタ パーク, ミルステイン ビルディング, メディミューン, リミテッド
- (72)発明者 ドラビック, スタイシー
アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイサースバーグ, ワン メディミューン ウェイ, メディミューン, エルエルシー
- (72)発明者 ショフィールド, ダレン
イギリス国 シービー21 6ジーエイチ ケンブリッジ, グランタ パーク, ミルステイン ビルディング, メディミューン, リミテッド
- (72)発明者 カルレッソ, ジャンルカ
イギリス国 シービー21 6ジーエイチ ケンブリッジ, グランタ パーク, ミルステイン ビルディング, メディミューン, リミテッド
- (72)発明者 ポリッツィ, クリステン
アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイサースバーグ, ワン メディミューン ウェイ, メディミューン, エルエルシー
- (72)発明者 メイゾール, ヤリフ
アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイサースバーグ, ワン メディミューン ウェイ, メディミューン, エルエルシー
- (72)発明者 オベスト, マイケル
アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイサースバーグ, ワン メディミューン ウェイ, メディミューン, エルエルシー
- (72)発明者 ハモンド, スコット, エー.
アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイサースバーグ, ワン メディミューン ウェイ, メディミューン, エルエルシー
- (72)発明者 ロボ, ブライアン
アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイサースバーグ, ワン メディミューン ウェイ, メディミューン, エルエルシー
- (72)発明者 マニクワル, プラカシュ
アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイサースバーグ, ワン メディミューン ウェイ, メディミューン, エルエルシー
- (72)発明者 シーマン, ジョナサン
イギリス国 シービー21 6ジーエイチ ケンブリッジ, グランタ パーク, ミルステイン ビルディング, メディミューン, リミテッド

- (72)発明者 ドベディ, サイモン
イギリス国 シービー21 6ジーエイチ ケンブリッジ, グランタ パーク, ミルステイン ビ
ルディング, メディミューン, リミテッド
- (72)発明者 ハーブスト, ロナルド
アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイサースバーグ, ワン メディミューン ウェ
イ, メディミューン, エルエルシー

審査官 宮岡 真衣

- (56)参考文献 国際公開第2014/209804 (WO, A1)
中国特許出願公開第104987421 (CN, A)
中国特許出願公開第104974253 (CN, A)
国際公開第2016/141387 (WO, A1)
国際公開第2017/106061 (WO, A1)
MAZOR Y. et al., mAbs, 2015年, 7:2, p.377-389
SENGERS B. et al., mAbs, 2016年05月24日, 8:5, p.905-915

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C07K 16/00-16/46
C12N 15/09-15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
PubMed
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
UniProt/GeneSeq